



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
BIOTEHNOLOGIJA



MODEL BIOPROCESA PROIZVODNJE ENZIMA IZ NUSPROIZVODA PRERADE ŽITA

doktorska disertacija

Mentor:
Doc. dr Damjan Vučurović

Kandidat:
Mirjana Jovanović, dipl. inž.

Novi Sad
2019

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru dr Damjanu Vučuroviću na stručnoj i nesebičnoj pomoći, koju mi je ukazao prilikom izrade ove disertacije.

Takođe se srdačno zahvaljujem dr Bojani Bajić, za korisne savete, sugestije, podršku i pomoć u istraživanju, pisanju disertacije i eksperimentalne izrade, kao i na širenju pozitivne energije u radnom okruženju.

Zahvaljujem se dr Radi Jevtić-Mučibabić, dr Vesni Vučurović i dr Vladimiru Puškašu na izuzetnoj časti koju mi je ukazao svojim učešćem u komisiji, na korisnim sugestijama i dobronamernim savetima.

Zahvaljujem se tehničkom osoblju na pomoći tokom eksperimentalne i tehničke izrade ovog rada.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj majci, užoj porodici i svojoj ćerki Anđeli koja je iako mala, razumela moje odsustvo.

Beskrajno hvala mom suprugu na ogromnoj ljubavi, bezgraničnom strpljenju, podršci i razumevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	5
3.1. AGROINDUSTRIJSKI OTPAD KAO SIROVINA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI	6
3.1.1. Struktura agroindustrijskog otpada	7
3.1.2. Primena agroindustrijskog otpada u različitim bioprocima	10
3.1.3. Nusproizvodi iz prerade žita i karakteristike pšenične plevice	11
3.2. BIOLOŠKI KATALIZATORI: ENZIMI	12
3.2.1. Amilaze	13
3.2.2. Celulaze	14
3.2.3. Ksilanaze	15
3.3. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA ENZIMA	16
3.3.1. Proizvodni mikroorganizmi	18
3.3.2. Sastav hranljive podloge	21
3.3.3. Proizvodni postupak i tehnike kultivacije mikroorganizama u proizvodnji enzima	23
3.3.4. Izdvajanje i prečišćavanje enzima	26
3.3.5. Primena enzima	27
3.4. PROJEKTOVANJE BIOPROCESA: MODELOVANJE I SIMULACIJA	29
3.4.1. Modelovanje i simulacije bioprocima	30
3.4.2. Značaj primene simulatora bioprocima	33
4. MATERIJAL I METODE	35
4.1. MATERIJALI	36
4.1.1. Proizvodni mikroorganizmi	36
4.1.2. Hranljive podloge	36
4.2. METODE	37
4.2.1. Tok kultivacije	37
4.2.2. Analitičke metode	38
4.2.3. Statistička obrada rezultata	40
4.2.4. Model i simulacija bioprocima	41
5. REZULTATI I DISKUSIJA	42
5.1. SASTAV SIROVINA	43
5.2. ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI I ODABIR PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA ZA PROIZVODNJU ENZIMA PRIMENOM SUBMERZNE I SOLID-STATE TEHNIKE KULTIVACIJE	44

5.3. TOK PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZNOM I SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE PLESENI NA PŠENIČNOJ PLEVICI	47
5.4. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZNOM TEHNIKOM KULTIVACIJE NA PŠENIČNOJ PLEVICI	49
5.4.1. Statistička obrada eksperimentalnih podataka proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	50
5.4.2. Matematički model za ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	53
5.4.3. Matematički model za aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	55
5.4.4. Matematički model za aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	58
5.4.5. Matematički model za aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	60
5.4.6. Optimizacija proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	63
5.5. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE NA PŠENIČNOJ PLEVICI	66
5.5.1. Statistička obrada eksperimentalnih podataka proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	67
5.5.2. Matematički model za ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	70
5.5.3. Matematički model za aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	73
5.5.4. Matematički model za aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	76
5.5.5. Matematički model za aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	78
5.5.6. Optimizacija proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice	81

5.6. MODEL BIOPROCESA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ NUSPROIZVODA PRERADE ŽITA	85
5.6.1. Opis modela bioprocasa	85
5.6.2. Specifikacija modela bioprocasa	88
5.6.3. Simulacija osnovnog slučaja	91
5.6.4. Simulacija sa koproizvodnjom	92
5.6.5. Ekonomska analiza	92
6. ZAKLJUČAK	99
7. LITERATURA	102
8. PRILOG	113

1. UVOD

Napredak u nauci i medicini, razvoj industrije i unapređenje poljoprivredne proizvodnje omogućili su kvalitetniji i duži život ljudi, ali su, eksplozija ljudske populacije i nesavesno ponašanje većine, stvorili brojne probleme poput uvećanih potreba za hranom, energijom i prostorom, izmenjenim ili uništenim brojnim ekosistema, uvećanim količinama akumuliranog otpada a sa njima i zdravstveni i bezbednosni rizici.

Radi prevazilaženja navedenih problema, danas se sve više teži održivom razvoju koji podrazumeva reciklažu otpadnog materijala i korišćenje obnovljivih resursa – vode, vazduha i biomase, alternativnim izvorima energije i čistijoj, ekološki prihvatljivoj proizvodnji. Iz biomase se potrebne hemikalije dobijaju fermentacijom šećernog supstrata ili hemijskom sintezom produkata fermentacije, zbog čega se svaki materijal koji u sebi sadrži šećere, može koristiti u biotehnološkoj proizvodnji.

Efikasno stvaranje fermentabilnih hidrolizata biomase jedan je od glavnih uslova za ekonomski konkurentnu proizvodnju brojnih proizvoda biotehnologije iz obnovljivih sirovina. Intenzivna istraživanja su trenutno usmerena ka poboljšanju hidrolitičke degradacije biomase. Ovi napori uključuju poboljšanja tehnologije predtretmana biomase i hidrolitičkih enzima, koji katalizuju konverziju složenih šećera do prostih, odnosno fermentabilnih.

U našem regionu se ne proizvode hidrolitički enzimi, već se za odgovarajuće potrebe uvoze iz inostranstva, iako naš region obiluje sirovinama za dobijanje enzima. Plevica, kao nusproizvod prerade žita, se dobija na samom početku ovog procesa i u skladu sa tim troškovi njenog dobijanja su mali.

S obzirom da je proces proizvodnje enzima iz plevice nedovoljno ispitan, javila se potreba za određivanjem optimalnih procesnih parametara dobijanja enzima kultivacijom plesni na hranljivim podlogama na bazi plevice, sa krajnjim ciljem projektovanja modela bioprocesa za proizvodnju enzima iz datog nusproizvoda prerade žita.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Svojim sastavom plevica predstavlja veoma atraktivnu sirovinu za proizvodnju enzima. Sa druge strane, dosadašnja upotreba ovog nusproizvoda prerade žita je bila samo kao hrana za stoku. Stoga se postavlja pitanje mogućnosti dobijanja veće ekonomske i ekološke dobiti primenom date sirovine za proizvodnju nekog visoko vrednog proizvoda, kao što su enzimi, uz valorizaciju ostalih izlaznih tokova procesa sa ciljem postizanja koncepta čistije proizvodnje, odnosno koncepta nulte emisije. Upravo simulacioni modeli postrojenja predstavljaju pomoćnu alatku za izvođenje ekonomske analize i drugih proračuna vezanih za bioprocen, a bitnih za projektovanje. Za potrebe generisanja ovakvih modela, a kasnije i kontrolu samog bioprocesa, nužno je poznavati kinetiku i kinetičke parametre vezane za dati proces. Utvrđivanje ovih kinetičkih jednačina ima smisla samo kada se bioprocen izvodi pod optimalnim uslovima. Da bi se proces optimizovao neophodno je detaljno proučavanje proizvodnje enzima kultivacijom nusproizvoda prerade žita pri različitim procesnim parametrima.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je optimizacija, modelovanje i simulacija dobijanja enzima kultivacijom plesni na podlogama koje kao osnovu sadrže plevicu primenom metode odzivne površine i programa SuperPro Designer, redosledom.

Optimizacija procesa će doprineti razumevanju različitih operativnih uslova, kao i međusobnih interakcija ovih varijabli na bioprocen kultivacije na datoj biomasi. Izvođenjem procesa pod optimalnim uslovima definisaće se uslovi koji će omogućiti projektovanje čitavog bioprocesa kroz simulaciju. Krajnji model bioprocesa će olakšati definisanje materijalnih i energetskih bilansa, dimenzionisanje opreme, pravljenje plana proizvodnje, analizu produktivnosti i uklanjanje „uskih grla“, analizu troškova, ekonomske isplativosti i kapaciteta proizvodnje, sprečavanje zagađenja i njenu kontrolu, itd.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. AGROINDUSTRIJSKI OTPAD KAO SIROVINA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI

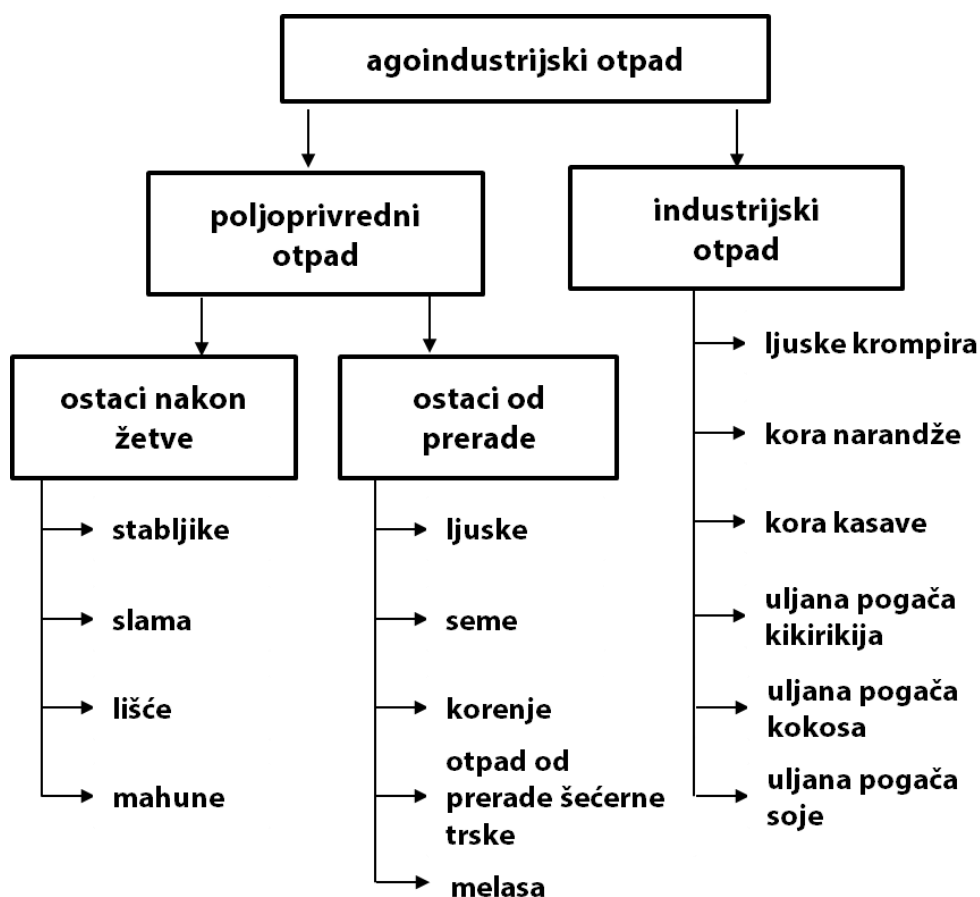
Pitanje obnovljivih izvora energije je aktuelno u svim razvijenim zemljama, a posebno u zemljama Evropske unije, gde je Direktivom Saveta Evrope o otpadu (EU 2008/98/EC), Aneksom II, regulisana lista mogućih aktivnosti za iskorišćenje biorazgradivog otpada, kakav je u najvećoj meri otpad agroindustrijskog kompleksa (Evropski katalog otpada i opasnog otpada, kategorija 02), u kojoj se pod tačkom R3 navodi reciklaža/rekultivacija organskih supstanci koje se ne koriste kao rastvarači uključujući kompostiranje i druge procese biološke transformacije. U tom smislu, biotehnološka proizvodnja proizvoda sa tržišnom vrednošću omogućava održivo upravljanje bioobnovljivim resursima i iskorišćenje biorazgradivog otpada pri čemu se unapređuje bezbednost i smanjuju štetne posledice njihovog korišćenja po životnu sredinu, a da pri tome nije ugrožen ekonomski razvoj.

Uzimajući u obzir porast populacije i razvoj industrije i poljoprivrede, količine poljoprivrednog, industrijskog i otpada iz domaćinstva se konstantno povećavaju i veliki značaj sa aspekta zaštite životne sredine predstavlja upravo pronalaženje načina za njegovo adekvatno zbrinjavanje. Jedan od načina za ekološki prihvatljivo zbrinjavanje agroindustrijskog otpada jeste njegova primena kao sirovine u različitim biotehnološkim procesima kojim će se dobiti proizvod sa tržišnom vrednošću. Sastav hranljive podloge značajno utiče na koncentraciju proizvoda, prinos i zapreminsku produktivnost, i njeno pravilno definisanje i optimizacija sastava imaju ključnu ulogu prilikom razvoja industrijskog bioprocasa. Primena agroindustrijskog otpada kao sirovine smanjuje troškove proizvodnje jer ovaj otpad predstavlja jeftinu i široko dostupnu sirovinu za proizvodnju najrazličitijih proizvoda. Ovaj tip otpada se smatra pogodnim za fermentaciju na čvrstim hranljivim podlogama, odnosno solid-state fermentaciju, međutim, može se koristiti i za submerznu fermentaciju (Sadh i sar., 2018; Anwar et al., 2014; Singh i sar., 2012).

3.1.1. STRUKTURA AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA

Poljoprivreda i industrija generišu velike količine otpada koji, ukoliko se sanira na adekvatan način može dovesti do zagađenja životne sredine i negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja (Sadh i sar., 2018). Agroindustrijski otpad se najčešće koristi kao stočna hrana, kompost ili se uklanja spaljivanjem. Međutim, zahvaljujući hemijskom sastavu, velikoj količini ugljenih hidrata, proteina, mineralnih materija i drugih mikronutrijenata, ovaj otpad se može posmatrati kao pogodan supstrat za mnoge biotehnoške procese (Mussato i sar., 2012; Salak i sar., 2013; Malherbe i Cloete, 2002; Howard i sar., 2003).

Agroindustrijski otpad obuhvata otpad iz poljoprivrede i otpad iz industrije (Slika 3.1), pri čemu otpad iz poljoprivrede obuhvata ostatke koji nastaju nakon žetve odnosno ubiranja poljoprivrednih kultura i otpad odnosno ostatke koji nastaju nakon prerade, a obuhvata slamu, stabljike, lišće, mahune, plevu, korenje i dr. Ovi ostaci se najčešće koriste kao hrana za životinje, đubriva ili se zaoravaju u zemljište. Industrijski otpad se takođe generiše u velikim količinama, obuhvata različite organske ostatke i slične efluente, a može se upotrebiti u različitim procesima (Sadh i sar., 2018; Singhania i sar., 2017).



Slika 3.1. Tipovi agroindustrijskog otpada

Agroindustrijski otpad predstavlja obnovljiv izvor energije koje se generiše tokom čitave godine i u značajnim količinama (Anwar i sar., 2014). Ovaj otpad sadrži značajne količine lignoceluloze koja predstavlja osnovnu strukturnu komponentu biljaka i primarni izvor obnovljive organske materije na zemlji (Pandey i sar., 2000).

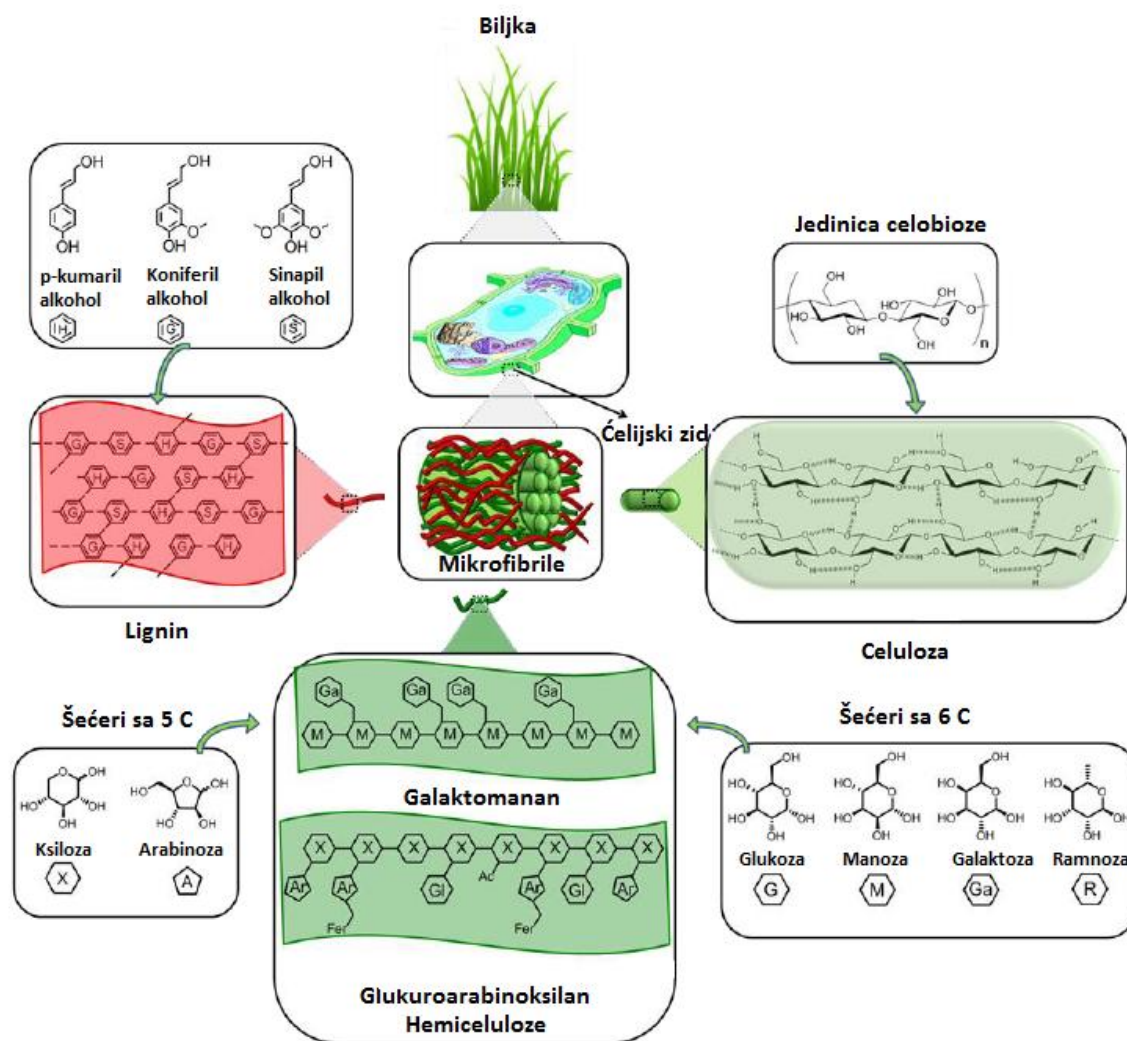
Upotreba agroindustrijskog otpada je značajna ukoliko se razmatra i sa ekonomskog i sa ekološkog aspekta. Ekonomski se bazira na činjenici da se ovaj otpad može upotrebiti kao jeftina sirovina u proizvodnji različitih proizvoda sa tržišnom vrednošću uz smanjenje cene proizvodnje. Pored toga, korišćenje agroindustrijskog otpada je opravdano i sa ekološkog aspekta jer većina ovog otpada sadrži različite zagađujuće materije koje nastaju njihovom razgradnjom i koje mogu izazvati zagađenje životne sredine (Mussatto i sar., 2012; Assareh i sar., 2012; Anwar i sar., 2014). Na osnovu navedenog može se zaključiti da se iskorišćenjem agroindustrijskog otpada rešava problem značajne količine nezbrinutog otpada, odnosno smanjuje se opterećenje životne sredine, dok se simultano proizvode različiti proizvodi sa dodatnom vrednošću, kao što su biogoriva, hemikalije, enzimi i dr. (Chapla i sar., 2010).

Najveći procenat agroindustrijskog otpada čini lignocelulozna biomasa, materijal bogat u najvećoj meri celulozom. Izuzev celuloze, otpad iz poljoprivrede i neke vrste otpada iz industrije sadrže i polisaharid skrob (Mihajlovski, 2016).

Žitarice, kao što su pšenica, pirinač, kukuruz, tapioka i krompir, koje sadrže polisaharid skrob imaju veoma važnu ulogu u ljudskoj ishrani (Van Der Maarel i sar., 2002). Granule skroba se sastoje od amiloze i amilopektina, koji čine od 98-99% suve materije (Tester i sar., 2004). Ovi polisaharidi se sastoje od anhidroglukoznih jedinica i na svakoj se nalaze tri slobodne hidroksilne grupe, izuzev u tačkama grananja gde se nalaze dve. Amiloza predstavlja linearan lanac u kome su D-glukopiranoze povezane α -(1-4) vezom. Kod određenih amiloza postoji od 9 do 20 grana po molekulu, sa dužinom od 4 do 100 anhidroglukozidnih jedinica. Stepenn grananja se povećava sa povećanjem molarne mase. Amilopektin je razgranati makromolekul koji ima veliku molekulsku masu. U osnovnom lancu D-glukopiranoze su povezane α -(1-4) vezom, dok se grananje ostvaruje kroz uspostavljanje α -(1-6) veza. Stepenn grananja amilopektina iznosi od 4 do 5% (Stojanović i sar., 2011).

Osobine skroba zavise od odnosa amiloze i amilopektina, ali takođe zavise i od ostalih komponenti, kao što su fosfati, lipidi, fosfolipidi, koje se nalaze u skrobnim granulama (Stojanović i sar., 2011). Za razgradnju skroba, usled njegove kompleksne strukture, je neophodna kombinacija hidrolitičkih enzima (Bertoldo i Antranikian, 2000).

Osnovne komponente lignocelulozne biomase su polimeri celuloza (40-50%), hemiceluloza (25-35%), lignin (15-20%) (slika 3.2), a potom u značajno manjoj meri zastupljene su acetil grupe, fenolna jedinjenja, minerali (Isikgor i Becer, 2015).



Slika 3.2. Osnovne komponente i struktura lignoceluloze

*Gl – glukuronska kiselina; Fer – esterifikacija ferulinskom kiselinom.

Celuloza je poznata kao glavna komponenta ćelijskog zida viših biljaka koja obezbeđuje čvrstoću drveta i čini 40-50% njegove suve mase. U pitanju je homopolisaharidni polimer sastavljen od molekula β -D-glukopiranoze povezanih (1→4)-glikozidnim vezama.

Molekuli celuloze su linearni, a stepen polimerizacije iznosi u proseku od 2000 do 27000 glukoznih jedinica i varira od sirovine do sirovine. Za razliku od glukoze u drugim glukanskim polimerima, osnovna jedinica koja se ponavlja je dimer koji čine dva molekula celuloze i koji se naziva celobioza. Strukturu upotpunjuju intramolekularne i intermolekularne vodonične veze koje povezuju glukozne jedinice, i na taj način se formira stabilna konfiguracija bez međumolekulskih šupljina. Čak i nakon dejstva hemijskih agenasa kao što su jake alkalije ili rastvaranjem celuloze kada dolazi do razaranja rešetke native celuloze, postoji mogućnost njene regeneracije.

Lanci celuloze nakon regeneracije nisu paralelni, ali su termodinamički stabilniji u poređenju sa nativnom celulozom. Budući da je gotovo polovina organskog ugljenika prisutna u biosferi u formi celuloze, konverzija celuloze u goriva i vredne hemikalije je od neprocenjivog značaja (Isikgor i Becer, 2015; Semenčenko, 2011; Chen i sar., 2017).

Pored celuloze, polimer koji je najviše zastupljen u lignoceluloznim sirovinama je hemiceluloza. Bitna razlika u odnosu na celulozu je amorfna struktura koju čini nekoliko heteropolimera uključujući ksilan, galaktomanan, glukuroksilan, arabinoksilan, glukomanan i ksiloglukan. Step en polimerizacije kod hemiceluloza je uglavnom oko 200, a sastav gradivnih jedinica takođe varira u zavisnosti od vrste sirovine. Hemiceluloze tvrdog i mekog drveta pokazuju bitnu razliku, u prvom slučaju u najvećoj meri je zastupljen ksilan, dok su kod drugog to glukomanani. Heteropolimeri koji izgrađuju hemicelulozu čine različite monosaharidne jedinice sa 5 i 6 ugljenikovih atoma: pentoze (ksiloza, arabinoza), heksoze (manoza, glukoza, galaktoza) i acetilovani šećeri. Hemiceluloze su ugrađene u ćelijski zid formirajući složenu mrežu veza povezivanjem celuloznih vlakana u mikrofibrile i umrežavanjem sa ligninom, čime se postiže čvrstina strukture (Isikgor i Becer, 2015; Semenčenko, 2011).

Lignin je trodimenzionalni polimer sastavljen iz fenilpropanoidnih jedinica. Monolignoli odnosno fenilpropanske jedinice, p-kumaril, koniferil ili sinapil alkohol povezuju se preko atoma kiseonika formirajući strukturu lignina. Osnovne fenilpropanoidne monomerne jedinice u polimeru lignina su p-hidroksifenil (H), guaicil (G) i siringil (S), respektivno. Hemijske veze između lignina i hemiceluloze i celuloze su estarske, etarske i glikozidne, pri čemu su etarske veze stabilnije u odnosu na estarske veze između lignina i ugljenih hidrata. Upravo zbog ovih veza je lignin veoma otporan na hemijsku i enzimsku razgradnju, a biološka razgradnja je moguća brojnim plesnima i pojedinim aktinomicetama. Lignin funkcioniše kao ćelijski lepak koji pruža moć kompresije biljnom tkivu i pojedinačnim vlaknima, čvrstinu ćelijskom zidu, i otpornost na insekte i patogene (Isikgor i Becer, 2015).

3.1.2. PRIMENA AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA U RAZLIČITIM BIOPROCESIMA

Agroindustrijski otpad sadrži značajne količine nutrijenata kao što su ugljeni hidrati, proteini i minerali, usled čega se mogu primeniti kao sirovina u različitim bioprocima za proizvodnju mnogobrojnih bioproizvoda i bioenergije (Sánchez, 2009, Pandey i sar., 2000; Kumar i sar., 2008; Perez i sar., 2002; Anwar i sar., 2014).

Upotreba industrijskog i poljoprivrednog otpada kao sirovina utiče na smanjenje troškova proizvodnje, ali i na zaštitu životne sredine usled njegove ponovne upotrebe. Različiti mikroorganizmi imaju sposobnost usvajanja nutrijenata iz agroindustrijskog otpada, pri čemu se mogu primeniti različite tehnike kultivacije (Sadh i sar., 2018).

Značajan broj radova i istraživanja koji se bave primenom različitog agroindustrijskog otpada za dobijanje različitih tržišno vrednih proizvoda se mogu pronaći u savremenoj naučnoj literaturi, a neki od njih su prikazani u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Agroindustrijski otpad kao sirovina za proizvodnju različitih tržišno vrednih proizvoda

AGROINDUSTRIJSKI OTPAD	PROIZVOD	REFERENCA
Ljuske krompira i surutka	Aceton, butanol, etanol	Abd-Alla i sar., 2017
Otpad pamuka	Bioetanol i biogas	Patel, 2017
Kukuruzovina	Enzimi i biogas	Wyman i sar., 2018
Stabljike pamuka	Bioetanol	Wang i sar.i, 2016
Kljuk grožđa i šećerne repe	Bioetanol	Rodriguez i sar., 2000
Pšenične mekinje, sojino brašno, brašno semena pamuka, kora narandže	Lipaza, CMCaza, α -amialza, β -glukozidaza	Ohara i sar., 2018
Pšenična slama	Mlečna kiselina	Cizeikiene i sar, 2018
Kukuruzni klip, ljuske kukuruza, pšenične mekinje	Rifamicin	Mahalaxmi i sar., 2010
Ljuske krompira	Ksantan	Vidhyalakshmi i sar., 2010
Otpad iz prerade šećerne trske, ljuske kafe, otpad kasave	Limunska kiselina	Vandenberghe i sar., 2000

3.1.3. NUSPROIZVODI IZ PRERADE ŽITA I KARAKTERISTIKE PŠENIČNE PLEVICE

Pšenica (*Triticum sp.*) je najznačajnija hranljiva žitarica za preko trećinu svetske populacije i sadrži više kalorija i proteina nego bilo koja druga prehrambena žitarica na svetu. Ima visoku nutritivnu vrednost, lako se skladišti i transportuje i može da se koristi za proizvodnju velikog broja proizvoda. Smatra se dobrim izvorom proteina, minerala, vitamina B grupe i dijetetskih vlakana (Kumar i sar., 2011). Pšenično zrno se koristi za proizvodnju brašna za različite tipove hleba, kolača, torti, testenine, nudli i kuskusa, potom za fermentaciju u proizvodnji piva, alkohola i biogoriva (Bledzki i sar., 2010).

Lignocelulozna ostaci dobijeni proizvodnjom pšenice i drugih poljoprivrednih useva, kakva je pšenična plevica, predstavljaju nedovoljno iskorišćen energetske resurs, koji potencijalno može biti upotrebljen kao alternativni izvor energije za rešavanje problema sve veće potražnje za energijom i zabrinutosti usled negativnog uticaja upotrebe fosilnih goriva na životnu sredinu (Sabarez i sar., 2014).

Otpad pšenice je godišnje obnovljiv izvor vlakna i dostupan je u velikim količinama na celom svetu. Pšenična pleвица je lignocelulozni otpadni proizvod i koji se može koristiti kao stočna hrana i gorivo (Bledzki i sar., 2010). Pšenična pleвица je suvi omotač semena žitarica i se sastoji iz manjih čestica, sadrži ljuske, delove ploda, kratku slamu, listove, semena korova i cela ili napukla zrna odvojena od sakupljene žitarice (McCartney i sar., 2006).

Plevica dobijena iz standardnih sistema žetve ima veoma malu gustinu koja zavisi od primenjene vrste i uslova žetve. Sa porastom gustine, raste i hranljiva vrednost pšenične plevice (McCartney i sar., 2006). Hemijski sastav pšenične plevice prikazan je u tabeli 3.2 (Bledzki i sar., 2010).

Tabela 3.2. Hemijski sastav pšenične plevice

SASTOJAK	(%)
Celuloza	36
Hemiceluloza	18
Lignin	16
Skrob	9
Proteini	6
Masti	5

Glavni faktori koji ograničavaju upotrebu nusproizvoda žitarica, slame, plevice i ostalih poljoprivrednih ostataka za primenu kao sirovine u nekom biotehnološkom procesu, su vezani za sakupljanje, skladištenje i transport ovih materijala i ekonomiku cele proizvodnje (Bledzki i sar., 2010).

3.2. BIOLOŠKI KATALIZATORI: ENZIMI

Enzimi su biohemijski katalizatori, predstavljaju molekule proteina velike molekulske mase, sa izuzetkom ribozoma koji su RNA molekuli, koji ubrzavaju hemijsku reakciju pri čemu se ne menjaju (Knežević-Jugović, 2008; Singhania i sar., 2010). Ovi biokatalizatori omogućavaju izvođenje na hiljade hemijskih reakcija koje se neprekidno odigravaju u ćelijama pri čemu dolazi do sinteze, razlaganja i međusobnog pretvaranja raznih hemijskih reakcija (Piletić i Milić, 1989). Glavna prednost enzima u odnosu na hemijske katalizatore se sastoji u velikoj brzini i efikasnosti dejstva u specifičnim fiziološkim uslovima niskog pritiska, temperature i vrednosti pH u vodenim rastvorima, zatim u odsustvu toksičnosti i lakoći zaustavljanja osetljivih reakcija i u visokoj supstratnoj specifičnosti koja isključuje sporedne reakcije (Đukić i Jemcević, 2004). Pored toga, enzimi su biodegradibilni i mogu se proizvesti iz mikroorganizama u velikim količinama bez upotrebe specifične hemijski otporne opreme (Smith, 2009)

Najvažnije osobine enzima su specifičnost i efikasnost. Specifičnost predstavlja njihovu sposobnost da reaguje sa ograničenim brojem veza u molekulima. Veoma često oni katalizuju ne samo promene jednog određenog jedinjenja nego i određenog optičkog izomera tog jedinjenja (Pejin, 2003). Katalitička funkcija enzima ne zavisi samo od njegove primarne molekulske strukture već i od specifične konfiguracije celog molekula. Remećenje konfiguracije, na primer promenom vrednosti pH ili temperature, može dovesti do gubitka aktivnosti. U industrijskim primenama ovo kao rezultat daje proizvode visokog kvaliteta, manje sporednih proizvoda i jednostavnije postupke izdvajanja i prečišćavanja (Smith, 2009). Efikasnost enzima se ogleda u sposobnosti da ubrzavaju hemijske reakcije u proseku oko milion puta. Jedan molekul enzima može da transformiše i po nekoliko miliona molekula supstrata za jedan minut. Jedinstvena osobina enzima je ta da su podložni regulaciji i kontroli, pa čak i autoregulaciji. Poseban značaj ima genetska kontrola sinteze enzima, a preko enzima geni kontrolišu metabolizam i sve biološke procese. Enzimi kontrolišu supstrat i produkt enzimske reakcije, a takođe na njega utiču promene vrednosti pH, temperature, prisustvo aktivatora i inhibitora (Pejin, 2003).

3.2.1. AMILAZE

Amilaze su enzimi koji katalizuju hidrolizu skroba do šećera kakvi su glukoza i maltoza i predstavnici ove grupe enzima su: α -amilaze, β -amilaze, glukoamilaze (poznate i kao amiloglukozidaze), pululanaze i izoamilaze (Liu i Kokare, 2017; Knežević-Jugović, 2008). α -amilaza (E.C. 3.2.1.1) deluje na jedinjenja skroba, stvarajući redukujuće šećere. Ona cepa amilozne i amilopektinske molekule u oligomere sa po 7 do 10 glukoznih ostataka u toku "otapajuće" faze. U sledećoj, fazi saharifikacije, amiloglukozidaza završava depolimerizaciju, pri čemu transformiše oligomere u skoro čistu glukozu (Đukić i Jemcev, 2004).

Amilaze se proizvode primenom različitih mikroorganizama, međutim za komercijalnu primenu ovih enzima, kao proizvodni mikroorganizmi najčešće se primenjuju vrste roda *Bacillus* (Barros et al., 2013). Biosintezu α -amilaze obavljaju mnoge bakterije i plesni. Bakterije producenti α -amilaze su: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldolyticus*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus subtilis* var. *amylosaccharaticus*, *Bacillus licheniformis*, bakterije rodova *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Athrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Thermomonospora* i *Serratia*. Plesni producenti α -amilaze su odgovarajuće vrste rodova: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Candida*, *Neurospora*, *Rhizopus*. Za industrijsku primenu α -amilaze se najčešće proizvode pomoću *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* i *Aspergillus oryzae*. U zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma, osobine α -amilaze se mogu razlikovati ne samo po mehanizmu delovanja na supstrat, nego i po optimalnim uslovima za maksimalne aktivnosti.

β -amilaze se mogu dobiti primenom sledećih mikroorganizama: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizopus japonicus*, dok se za proizvodnju glukoamilaza primenjuju: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopusformosaensis* i *Rhizopus japonicus* (Crueger i Crueger, 1994; Pejin, 2003).

Amilaze predstavljaju jedne od najznačajnijih enzima i imaju veliki značaj u biotehnologiji (Kaur i sar., 2015). Najvažnije oblasti njihove primene u industriji su u proizvodnji glukoznih sirupa i glukoze, proizvodnji maltoznih sirupa i maltoze, proizvodnji dekstrana, kao i u pivarstvu, poljoprivredi, pekarstvu, proizvodnji sokova i tekstilnoj industriji (Knežević-Jugović, 2008).

Pored sintetičkih hranljivih podloga, za proizvodnju amilaza su uspešno primenjeni i različiti prirodni supstrati, kao što su pšenične mekinje, pirinčane mekinje, uljana pogača, slama pšenice i kukuruza i otpad šećerne trske (Saxena and Singh, 2011; Kaur et al., 2015).

3.2.2. CELULAZE

Celulaze su veoma značajna grupa enzima koji katalizuju hidrolizu β -1,4-glikozidne veze u molekulu celuloze (Behera i sar., 2017). Depolimerizacija celuloze do glukoze zahteva sinergističko delovanje tri celulaze: endoglukanaze, egzoglukanaze i β -glukozidaze (Juturu i Wu, 2014). Endoglukanaze (E.C. 3.2.1.4) katalizuju nasumično raskidanje unutrašnjih veza u lancu celuloze, egzoglukanaze (E.C. 3.2.1.91) raskidaju veze sa kraja lanca oslobađajući pri tome celobiozu, dok β -glukanaze (E.C. 3.2.1.21) koje deluju samo na celooligosaharide i celobiozu oslobađaju glukozne monomerne jedinice iz supstrata (Jorgensen i sar., 2007; Behera i sar., 2017).

Uzimajući u obzir da je celuloza najrasprostranjeniji polisaharid u biljnom svetu celulaze predstavljaju veoma značajnu grupu enzima (Knežević-Jugović, 2008). Uspešnost celulaza u procesima konverzije biomase zavisi od nekoliko osobina kao što su stabilnost, specifičnost, sinergizam između različitih enzima, uspešnost vezivanja za celulozu, ali i fizičkih karakteristika kao i sastava celulozne biomase (Heineman i sar., 2009).

Mnoga istraživanja su izvedena sa ciljem optimizacije medijuma za proizvodnju celulaza primenom različitih lignoceluloznih materijala i plesni, bakterija i aktinomiceta kao proizvodnih mikroorganizama (Oberoi et al., 2010). Celulozne enzime proizvode različite bakterije i plesni, aerobi i anaerobi, mezofili i termofili. Međutim, relativno mali broj plesni i bakterija proizvode velike količine ekstracelularnih celulaza koje imaju mogućnost razlaganja celuloze i proizvodnje sve tri celulaze neophodne za razgradnju.

Bakterije koje proizvode celuloze mogu biti aerobne i anaerobne i pripadaju rodovima *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas* i *Clostridium*. Najveći broj celulaza koji se koriste za industrijske primene se dobijaju iz filamentoznih plesni, koje pripadaju rodovima *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*. Ove filamentozne plesni proizvode komplekse celulaza sa sva tri enzima u različitim odnosima koji su neophodni za potpunu hidrolizu celuloze (Kuhad i sar., 2016).

Celulaze proizvode aerobne mezofilne plesni kao što su: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium funiculosum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani* i *Aspergillus niger*. Pored toga, veoma aktivne komplekse celulaza i hemicelulaza proizvode termofilne plesni (*Chaetomium thermophilum*, *Humicola insolens*, *Sporotrichum thermophile*, *Talaromyces emersonii*, *Thermoascus aurantiacus*), mezofilne anaerobne plesni (*Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum*, *Orpinomyces* sp., *Sphaeromonas communis*), mezofilne i termofilne aerobne bakterije (*Bacillus* spp., *Cellulomonas fimi*, *Cellvibrio* sp., *Pseudomonas fluorescens*), mezofilne i termofilne anaerobne bakterije (*Bacteroides cellulosolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*), kao i aktinomicete (*Microbispora bispora*, *Streptomyces flavogriseus*, *Thermomonospora fusca*). Takođe, različiti hipertermofilni mikroorganizmi, koji rastu na temperaturama od 85 °C do 110 °C, proizvode ove enzime (*Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Pyrococcus furiosus* i *Anaerocellum thermophilum*) (Szakacs i sar., 2006).

Celulaze su komercijalno dostupne više od 30 godina i imaju veliku primenu u mnogim granama industrije kao što su prehrambena industrija, pivarstvo, vinarstvo, poljoprivreda, industrija pulpe i papira, kao i tekstilna industrija (Ferreira i sar., 2014). Celulaze su veoma značajni ali i veoma skupi enzimi usled čega je za njihovu komercijalnu primenu veoma važno smanjenje troškova proizvodnje. Strategije za proizvodnju celulaza koje bi omogućile ekonomičnije procese biorafinerijama obuhvataju povećanje komercijalne proizvodnje enzima, korišćenje jeftinih sirovina za enzimsku proizvodnju, proizvodnja enzima bolje stabilnosti i proizvodnja celulaza sa visokom specifičnom aktivnošću na čvrstim supstratima (Zhang i sar., 2006).

3.2.3. KSILANAZE

Ksilanaze su grupa hidrolitičkih enzima koja razlaže linearni polisaharid ksilan u ksilozu katalizujući hidrolizu β -1,4 glikozidne veze. Ksilan je najznačajniji konstituent hemiceluloze. Ksilanaze predstavljaju deo ksilanolitičkog enzimskog sistema koji obuhvata endoksilanaze, β -ksilozidaze, α -glukuronidaze, α -arabinofuranozidaze i acetilksilan esteraze.

Ksilanaze se mogu klasifikovati na nekoliko načina: na osnovu molekulske mase i izoelektrične tačke, kristalne strukture i kinetičkih osobina, ili specifičnosti prema supstratu i profilu proizvoda (Liu i Kokare, 2017; Walia i sar., 2017; Burlacu i sar., 2016).

Potpuna i efikasna enzimaska hidroliza kompleksnog polimera ksilana zahteva prisustvo niza enzima različitih specifičnosti i mehanizama delovanja. Endo-1,4- β -D-ksilanaza (E.C.3.2.1.8) nasumično cepa osnovni lanac ksilana, β -D-ksilozidaza (E.C.3.2.1.37) cepa monomere ksiloze, dok je uklanjanje bočnih grupa katalizovano α -L-arabinofuranozidazom (E.C.3.2.1.55), α -D-glukuronidazom (E.C.3.2.1.139) i acetilksilan esterazom (E.C.3.1.1.72) koje uklanjaju acetil i fenolne bočne grane i imaju sinergističko delovanje na kompleksni polimer (Collins i sar., 2005; Beg i sar., 2001).

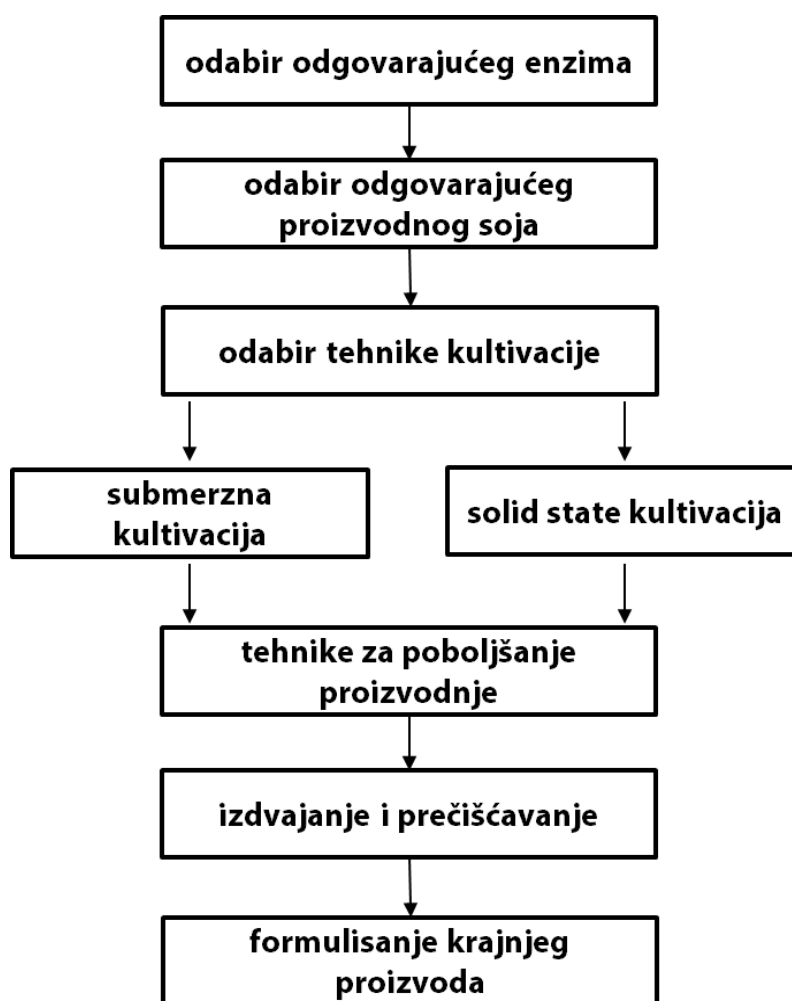
Ksilanaze proizvode mnogi organizmi, međutim, najveći komercijalni značaj imaju ksilanaze proizvedene filamentoznim plesnima (Polizeli i sar., 2005). U prirodi ksilanaze proizvode mikroorganizmi koji se najčešće nalaze u ekološkim nišama gde se nakuplja i razlaže biljni materijal. Kompletan ksilanolitički enzimski sistem je široko rasprostranjen u plesnima, aktinomicetama i bakterijama, a najznačajniji produceri su: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Fibrobacteres*, *Clostridia* i *Bacillus*. Ispitana je proizvodnja ksilanaza i sa sojevima: *Penicillium canescens*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium clerotiorum*, *Streptomyces* sp. P12–137, *Thermomyces lanuginosus* SD-21, *Acremonium furcatum*, *Aspergillus niger* PPI, *Neocallimastix* sp. L2, *Cochliobolus sativus* Cs6, *Bacillus circulans* D1, *Streptomyces* sp. Ib 24D i *Paecilomyces themophila* J18 (Motta i sar., 2013).

Potencijalna upotreba ksilanaza uključuje biokonverziju lignoceluloznih materijala i poljoprivrednog otpada u fermentativne proizvode, bistrenje sokova, poboljšanje konzistencije piva i digestibilnosti hrane za stoku. Jedna od najvažnijih biotehnoloških primena ksilanaza je izbeljivanje celuloze. Ksilanaze se takođe mogu koristiti u proizvodnji veštačke svile, celofana i nekoliko hemikalija kao što su celulozni estri (acetati, nitrati, propionati i butirati) i celulozni etri (karboksimetil celuloza, metil i etil celuloza), koji se proizvode rastvaranjem celuloze i prečišćavanjem vlakana od ostalih ugljenih hidrata. Enzimskom hidrolizom ksilana se mogu dobiti ksilooligosaharidi, koji se mogu koristiti kao farmaceutski, poljoprivredni i prehrambeni proizvodi (Motta i sar., 2013).

3.3. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA ENZIMA

Najveći broj enzima se komercijalno proizvodi primenom mikroorganizama, submerznom tehnikom kultivacije iako se u nekim proizvodnim procesima primenjuje solid-state kultivacija (Singhania i sar., 2010). Oko 90% komercijalnih enzima se proizvodi primenom mikroorganizama, plesni, bakterija i kvasaca, dok se preostalih 10% dobija iz različitih životinjskih (oko 6%) i biljnih (oko 4%) vrsta (Smith, 2009).

Najznačajniji industrijski enzimi su proizvedeni mikroorganizmima koji imaju GRAS (eng. *Generally recognized as safe* - opšte prepoznat kao siguran) status, međutim, neki enzimi se i dalje ekstrahuju iz životinjskog ili biljnog tkiva. Komercijalni enzimi izolovani iz biljaka obuhvataju proteolitičke enzime papain, bromelain i ficin, kao i neke druge specifične enzime kakva je lipoksigenaza iz soje. Enzimi izolovani iz životinja obuhvataju proteinaze kao što su pepsin i renin. Opšta šema proizvodnje enzima je prikazana na slici 3.3 (Singhania i sar.,2010).



Slika 3.3. Opšta šema proizvodnje enzima

Kriterijumi koji se koriste za odabir industrijskog enzima obuhvataju specifičnost, brzinu reakcije, pH i temperaturni optimum i stabilnost, uticaj inhibitora, kao i afinitet prema supstratu. Traže se specifični enzimi sa specifičnim osobinama potrebnim za određenu primenu. Na primer, enzimi koji se koriste u industriji papira ne smeju da imaju aktivnost degradacije celuloze kao sporednu aktivnost jer bi u tom slučaju oni degradirali vlakna celuloze (Singhania i sar.,2010).

Prilikom odabira odgovarajućeg izvora za proizvodnju enzima različiti aspekti se moraju uzeti u obzir. Mikroorganizmi predstavljaju najpogodnije izvore industrijskih enzima, za razliku od biljaka ili životinja, zahvaljujući velikoj brzini umnožavanja i jednostavnosti kultivisanja (Singhania i sar.,2010). Odabir odgovarajućeg mikroorganizma producenta u proizvodnji komercijalnih enzima podrazumeva ispitivanje nekoliko stotina vrsta sa ciljem otkrivanja i izolovanja iz mešovite populacije mogućih kandidata za dobijanje željenih enzima. Nakon toga sledi izdvajanje potencijalnih korisnih mikroorganizama, odnosno odbacivanje onih koji ne zadovoljavaju uslove koji se postavljaju pred proizvodni mikroorganizam (Dodić i Grahovac, 2013).

Nakon odabira proizvodnog organizma potrebno je razviti proces proizvodnje i odabrati tehniku kultivacije. Submerzna tehnika se najčešće koristi u industrijskoj proizvodnji enzima, međutim, solid-state tehnika se sve više primenjuje usled velikog potencijala koji ima pri proizvodnji enzima na agroindustrijskim ostacima i otpadu. Mnoga istraživanja se bave ispitivanjem i poređenjem submerzne i solid-state tehnike kultivacije sa ciljem poboljšanja produktivnosti enzima, smanjenja proizvodnih troškova i uštede energije (Singhania i sar., 2010; de Souza Vandenberghe et al., 2016; Bharathiraja et al., 2017).

Postupci izdvajanja i prečišćavanja industrijskih enzima zavise od potrebnog stepena čistoće na šta utiče njihova primena. Industrijski enzimi koji se proizvode u velikim količinama se najčešće ne prečišćavaju već se prodaju kao koncentrovane tečnosti ili granulirani suvi proizvodi. Enzimi koji se koriste za posebne namene, kao što je dijagnostika ili DNA tehnologija, moraju biti potpuno prečišćeni (Singhania i sar.,2010).

3.3.1. PROIZVODNI MIKROORGANIZMI

U proizvodnji enzima najekonomičnija je primena tehnološki poznatih mikroorganizama usled toga što je proizvodni postupak u velikim razmerama poznat, bioprocesi se lako mogu kontrolisati pri čemu se dobijaju enzimski preparati ustaljenog kvaliteta. Prinos enzima se može povećati izborom prirodnog soja proizvodnog mikroorganizma, oplemenjivanjem prirodnog soja, klasičnim postupcima selekcije, optimizacijom hranljive podloge i uslova kultivacije, uticajem na regulatorne mehanizme, kao i primenom genetičkog inženjerstva (Knežević-Jugović, 2008).

Kod izbora proizvodnog mikroorganizma najbitnija je sposobnost proizvodnje željenog enzima (Pejin, 2003). Mikroorganizmi koji proizvode ekstracelularne enzime su pogodniji od onih koji proizvode intracelularne, zato što je njihovo izdvajanje i prečišćavanje jednostavnije. Intracelularni enzimi se moraju izdvojiti od velikog broja različitih ćelijskih proteina i drugih komponenata. Takođe proizvodni mikroorganizam bi trebalo da ima GRAS status, što je veoma značajno kada proizvedeni enzim ima primenu u prehrambenoj industriji.

Dodatno, proizvodni mikroorganizam bi trebalo da proizvodi velike količine željenog enzima u pogodnom vremenskom intervalu (Singhania i sar., 2010).

Mirkoorganizmi izolovani iz prirode koji se koriste za proizvodnju enzima mogu biti bakterije, plesni, kvasci ili aktinomicete. Mikroorganizmi mogu istovremeno sintetisati čitav kompleks enzima (Pejin, 2003). Najčešće se kao proizvodni mikroorganizam za proizvodnju enzima primenjuju plesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* i *Trichoderma*, bakterije roda *Bacillus*, aktinomicete roda *Streptomyces* i kvasci roda *Saccharomyces* (Dodić i Grahovac, 2013). U tabeli 3.3 su prikazani proizvodni mikroorganizmi koji se koriste za proizvodnju različitih enzima, kao i tehnike kultivacije koje se koriste u tim proizvodnim procesima (Patel i sar., 2017).

Rod *Aspergillus* predstavlja grupu filamentoznih plesni sa velikim brojem vrsta (De Vries i Visser, 2001). Plesni iz roda *Aspergillus* se obično nalaze u zemljištu i biljnim ostacima (Fleißner i Dersch, 2010). Mnogi predstavnici ovog roda imaju veliki industrijski značaj (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *A. terreus*), ali postoji i određen broj vrsta koji je patogen prema životinjama i/ili biljkama (*A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*). U biotehnologiji se koriste za proizvodnju različitih proizvoda, kao što su organske kiseline, farmaceutici, proteini i enzimi (De Vries i Visser, 2001; Meyer i sar., 2011; Lubertozzi i Keasling, 2009). Vrste ovog roda imaju veliku primenu u industrijskoj proizvodnji enzima, produkuju sve enzime koji su uključeni u biorazgradnju celuloze, odnosno endoglukanaze, celobiohidrolaze, β -glukozidaze i egzoglukanaze. Pored toga produkuju i amilaze, proteaze, glukoza oksidaze, katalaze, pektinaze, lipaze, fitaze i ksilanaze koje imaju veliku primenu u prehrambenoj industriji, kao i u tekstilnoj i industriji papira (Fleißner i Dersch, 2010; De Vries i Visser, 2001). Posebna odlika roda *Aspergillus* jeste njegova mogućnost da toleriše ekstremne uslove kultivacije, širok opseg temperatura (10-50°C), vrednosti pH (2-11) saliniteta (0-34%), aktivnosti vode (0,6-1), kao i različitog sastava hranljive podloge, usled čega može da se koristi i za submerznu i za solid-state kultivaciju (Meyer i sar., 2011).

Plesni iz roda *Penicillium* su široko rasprostranjene u prirodi i najpoznatije su po proizvodnji antibiotika penicilina. Poslednjih godina vrste ovog roda dobijaju sve veći značaj u proizvodnji celuloznih enzima usled toga što proizvode sve enzime potrebne za degradaciju celuloze. Naime, imaju mogućnost proizvodnje β -glukozidaze u dovoljnim količinama što im daje prednost u odnosu na vrste roda *Trichoderma* (Gusakov i Sinitsyn, 2012; Vaishnav i sar., 2018). Širok raspon ekstracelularnih enzima produkovanih od strane roda *Penicillium* ima važnu ulogu u mikrobiološkoj razgradnji organskih materija. Značajni primeri hidrolaza uključuju i različite celulozitičke enzime i ostale polisaharaze, kao što su α - i β -glukanaze, hemicelulaze i peptidaze, zajedno sa različitim lipazama i proteolitičkim enzimima koji su odgovorni za razvoj karakterističnog ukusa sazrelog sira (Hamlyn i sar., 1987).

Tabela 3.3. Mikroorganizmi koji se koriste za proizvodnju određenih enzima

ENZIM	PROIZVODNI MIKROORGANIZAM	TEHNIKA KULTIVACIJE
Amilaze (α - i gluko)	Bakterije (<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>)	SmF
	Plesni (<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp.)	SSF i SmF
Proteaze	Bakterije (<i>B. amyloliquifaciens</i>)	SmF
	Plesni (<i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Penicillium chrysosporium</i> , <i>R. oligosporus</i>)	SSF i SmF
Glukoza oksidaza	Plesni (<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp.)	SSF i SmF
Pektinaze	Plesni (<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp.)	SSF i SmF
Laktaze	Kvasci (<i>Kluceroomyces</i>)	SmF
Celulaze	Plesni (<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Humicola grisea</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Chrysosporium lucknowense</i> , <i>Acremonium</i> sp.)	SSF i SmF
	Plesni (<i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Trichoderma</i> sp.)	SSF i SmF
Lipaze i proteinaze	<i>A. oryzae</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcaligena</i> ssp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Candida albicans</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i>	SSF
	<i>Aspergillus</i> sp., <i>A. ficuum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> , <i>Anthomonas oryzae</i>	SSF
Dekstrinaze	Plesni	SSF
Invertaze	Kvasci (<i>Saccharomyces</i>)	SmF
Laktaze i peroksidaze	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Basidiomycetes</i>	SSF
Hemicelulaze	Plesni (<i>A. niger</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Penicillium</i> sp.)	SSF i SmF
Katalaze	<i>Aspergillus</i> sp.	

*SmF – submerzna tehnika kultivacije

*SSF – solid-state tehnika kultivacije

Vrste roda *Trichoderma* su filamentozne plesni koje najčešće žive u zemljištu i predstavljaju najčešće gajene mikromicete koje zahvaljujući specifičnim osobinama imaju primenu u mnogim bioprocima. Njihov teleomorfni stadijum pripada rodu *Hypocrea* (*Ascomycotina*, *Pyrenomyces*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*) (Kosanović, 2015). Gljive iz roda *Trichoderma* imaju veliku primenu u industrijskoj proizvodnji, neke od njih su dobri biološki agensi, a neke proizvode velike količine celuloznih enzima.

Vrste *Trichoderma reesei* su najviše ispitivane zbog proizvodnje industrijskih enzima, dok su vrste *T. harizanum*, *T. atroviride* i *T. asperellum* poznate kao agensi biološke kontrole fitopatogenih gljiva i kao proizvođači antibiotika (Peterson i sar., 2012; Saranraj i sar., 2012; Ruocco, 2009).

Velika većina saznanja o enzimskoj razgradnji celuloze proističe iz ispitivanja celulolitičkih enzima koje proizvodi plesan *Trichoderma reesei*. Ovaj enzimski kompleks sadrži najmanje pet različitih endoglukanaza, dve vrste celobiohidrolaza, kao i određen broj ksilanaza i najmanje jedan enzim β -ksilozidaze. *Trichoderma reesei* proizvodi i β -glukozidaze. Međutim, veliki deo ovog enzima je vezan za micelijum i zbog toga se ne može u dovoljnoj meri izdvojiti tokom industrijske proizvodnje celulaza (Vučurović, 2015).

3.3.2. SASTAV HRANLJIVE PODLOGE

Hranljiva podloga mora da obezbedi sve komponente koje su neophodne za rast proizvodnog mikroorganizma, energiju za metabolizam i sve komponente neophodne za sintezu enzima (Pejin, 2003). Formulacija hranljive podloge u najvećoj meri zavisi od fizioloških svojstava primenjenog mikroorganizma, načina kultivacije i samog enzima koji se proizvodi (Dodić i Grahovac, 2013).

U tečnim podlogama koje se koriste za proizvodnju enzima, kao izvori ugljenika mogu da se upotrebe različiti ugljeni hidrati, organske kiseline ili etanol. Kao izvori azota mogu se dodati mineralne soli (soli azotne kiseline i amonijumove soli) ili organski izvori azota kao što su peptidi, aminokiseline, urea i sl. Fosfor stimuliše biosintezu amilaza, proteaza i pektolitičkih enzima, u podlogu se dodaje u obliku soli fosforne kiseline, ređe u obliku organskih jedinjenja. Tečne podloge treba da sadrže i različite vitamine, mikroelemente i faktore rasta. Tečnim podlogama je neophodno podesiti pH vrednost na optimum za sintezu enzima (Dodić i Grahovac, 2013).

Kao čvrste hranljive podloge u proizvodnji enzima upotrebljavaju se krupno samlevene mekinje pšenice, pšenična slama, sladne klice pulpa kafe, usitnjeno jagodičasto voće, rezanci šećerne repe i drugi prirodni materijali. U ovakvim podlogama je, takođe, moguće korigovanje pH ukoliko je to neophodno (Dodić i Grahovac, 2013).

U savremenoj naučnoj literaturi moguće je pronaći veliki broj istraživanja koja se bave ispitivanjem različitih aspekata proizvodnje enzima na hranljivim podlogama koje se sastoje od različitih agroindustrijskih nus proizvoda, ostataka ili otpada. Tako, istraživanja koja su izveli Irshad i saradnici (2013) su obuhvatala proizvodnju enzima β -glukozidaze primenom *Trichoderma viride* kao proizvodnog mikroorganizma na hranljivoj podlozi koja se sastojala od kore narandže, primenom solid-state tehnike kultivacije. Ista vrsta agroindustrijskog otpada,

kora narandže je zajedno sa kominom od grožđa primenjena u solid-state kultivaciji *Aspergillus awamori* pri čemu je ispitana proizvodnja tri hidrolitička enzima (Díaz i sar., 2013). Takođe, istraživanja koja su izveli Irshad i saradnici (2013) su pokazala da je od nekoliko ispitanih agroindustrijskih sirovina, otpadna kora narandže najbolji supstrat za proizvodnju celulaza primenom plesni *Trichoderma viride*. Ova sirovina je takođe upotrebljena za ispitivanje proizvodnje multienzimskog preparata koji sadrži pektinolitičke, celulolitičke i ksilanolitičke enzime solid-state kultivacijom plesnima *Aspergillus niger* BTL, *Fusarium oxysporum* F3, *Neurospora crassa* DSM 1129 i *Penicillium decumbens* (Mamma et al., 2008). Biz i saradnici (2016) su ispitali proizvodnju pektinaza solid-state fermentacijom otpada citrusnog voća i otpada iz proizvodnje šećerne trske sa mikroorganizmom *Aspergillus oryzae* u bioreaktoru sa fiksnim slojem. Otpadno lišće i pseudostem banane su upotrebljeni kao supstrati u proizvodnji lignolitičkih i celulolitičkih enzima u solid-state fermentaciji *Pleurotus ostreatus* i *P. sajor-caju* u istraživanjima Reddy i saradnici (2003). Asgher i saradnici (2011) su ispitali mogućnost primene plesni *Phanerochaete chrysosporium* IBL-03 u proizvodnji lignolitičkih enzima na različitim supstratima: slama pšenice i pirinča, stabljike banane, klipovi kukuruza, kukuruzovina i otpad iz prerade šećerne trske. Za proizvodnju enzima laktaze solid-state kultivacijom, Stoilova i saradnici (2010) su upotrebili hranljivu podlogu koja se sastojala od pšeničnih mekinja, ovsene slame i otpada cvekle, pri čemu je potrebna vlažnost supstrata korigovana dodatkom odgovarajućeg rastvora soli.

Pšenične mekinje su upotrebljene kao supstrat u solid-state kultivaciji za proizvodnju celulaza (Singhania i sar., 2007; Farinas i sar., 2011) i ksilanaza (Pirota i sar., 2013), dok su Pitol i saradnici (2016) za proizvodnju pektinaza upotrebili pšenične mekinje i otpad iz proizvodnje šećerne trske.

Kao supstrati za proizvodnju enzima solid-state fermentacijom primenjene su pirinčane mekinje, pšenične mekinje, pšenična slama, kukuruzovina, slama uljane repice, trska, otpad od prerade šećerne trske, kukuruzni klipovi, ljuške različitog voća i povrća, piljevina, trava, lišće, ljuška pirinča, mešavina kuhinjskog otpada (Latifian i sar., 2007; Jecu, 2000; Iqbal i sar., 2011; Gao i sar., 2008; Bansal i sar., 2012). Za proizvodnju različitih enzima koji razlažu lignoceluloznu biomasu kao supstrati su upotrebljeni: slama pšenice, lišće bukve, kora mandarine, banane i jabuke, mekinje pšenice i soje, otpad iz proizvodnje šećerne trske i prerade narandži, ljuške soje (Elisashvili i sar., 2008; Papinutti i Forchiasin, 2007; Delabona i sar., 2013; Brijwani i sar., 2010).

3.3.3. PROIZVODNI POSTUPAK I TEHNIKE KULTIVACIJE MIKROORGANIZAMA U PROIZVODNJI ENZIMA

Tehnološki proces proizvodnje enzima sastoji se iz pripreme inokuluma, kultivacije proizvodnog mikroorganizma sa ciljem biosinteze enzima, kao i izdvajanja i prečišćavanja dobijenih enzima do željenog oblika. Za pripremu inokuluma koristi se mikroorganizam koji ima odgovarajuća svojstva, može biti pripremljen na čvrstoj ili tečnoj podlozi pri čemu može biti u obliku spora ili u vegetativnom obliku. Prilikom pripreme inokuluma podešavaju se svi uslovi kultivisanja koji će obezbediti dobijanje što veće količine one forme mikroorganizama kojom će se inokulisati hranljiva podloga (Knežević-Jugović, 2008). Uspešno vođenje procesa biosinteze i postizanje visokih prinosa proizvoda osigurava se upotrebom optimalne hranljive podloge, osiguranjem rasta čiste kulture mikroorganizama bez kontaminacije drugim mikroorganizmima, snabdevanjem kulture dovoljnim količinama kiseonika, održavanjem potrebne temperature i vrednosti pH tokom kultivacije i sprečavanjem intenzivnog penjenja kulture (Pejin, 2003).

Uzimajući u obzir da proizvodni mikroorganizmi mogu da rastu na površini čvrstih i tečnih hranljivih podloga, ili u čvrstim i tečnim hranljivim podlogama, postoje tri osnovne tehnike izvođenja bioprocasa (Dodić i Grahovac, 2013):

- submerzna (dubinska) ili SmF – *Submerged Fermentation*,
- emerzna (površinska) i
- na čvrstim (SSF – *Solid-State Fermentation*) hranljivim podlogama.

U proizvodnji enzima se za sada veoma retko primenjuje površinsko gajenje mikroorganizama na površini tečne podloge (Knežević-Jugović, 2008). Submerzna i solid-state tehnika kultivacije se učestalo primenjuju u proizvodnji enzima. Obe tehnike imaju određene prednosti, ali i ograničenja. U industriji se danas najčešće koristi submerzna tehnika kultivacije u proizvodnji enzima, međutim u određenim slučajevima i za određene primene solid-state kultivacija se sve više primenjuje (Patel i sar., 2017). Tako na primer, najveća količina celulaza se proizvodi primenom solid-state kultivacije sa divljim sojevima mikroorganizama, dok se oko 90% svih industrijski proizvedenih enzima dobija primenom submerzne tehnike i veoma često genetski modifikovanih mikroorganizama (Ray i Behera, 2017).

Submerzna kultivacija se definiše kao kultivacija u prisustvu viška vode. Ova tehnika nudi dobru kontrolu i praćenje procesnih parametara, jednostavno upravljanje i povećanje razmera procesa (Yoo i sar., 2017). Submerzna tehnika kultivacije predstavlja izvođenje bioprocasa u tečnoj hranljivoj podlozi uz mešanje i aeraciju kod aerobnog procesa, čija osnovna karakteristika predstavlja formiranje i održavanje međufazne površine gas-tečnost dispergovanjem gasa u tečnosti uvođenjem energije u sistem (Dodić i Grahovac, 2013).

Ova tehnika danas ima najveću industrijsku primenu za proizvodnju enzima posebno u slučajevima kada se kao proizvodni mikroorganizam ne koriste plesni. Proizvodnja enzima se najčešće izvodi u šaržnim bioreaktorima sa intenzivnim mešanjem, zapremine između 0,1 i 250 m³, koji su snabdeveni sistemima za aeraciju obzirom da je većina ovih bioprocesa aerobna. Za uspešno odvijanje bioprocesa neophodno je da bioreaktori imaju mogućnost automatskog merenja i kontrole parametara procesa koji su prethodno optimizovani: temperatura, vrednost pH, pritisak, zapremina tečnosti, brzina mešanja, protok vazduha, prisustvo pene, nivo rastvorenih gasova i jonskih vrsta (Knežević-Jugović, 2008). Veliki nedostatak ove tehnike jeste što su koncentracije proizvedenih enzima niske. Cena izdvajanja i prečišćavanja proizvoda je obrnuto proporcionalna koncentraciji proizvoda u fermentacionoj tečnosti, usled čega je neophodno optimizovati koncentraciju proizvoda kako bi proizvodnja enzima bila ekonomski izvodljiva (Yoo i sar., 2017).

Iako je dugo vremena solid-state tehnika kultivacije bila potisnuta submerznom tehnikom, poslednjih godina ponovo privlači pažnju zbog brojnih prednosti kao što su mala investiciona ulaganja i velika ekonomičnost. Pored toga, njena primena ima veliki značaj kada se sirovi proizvod fermentacije može direktno koristiti kao enzimski preparat, čak i bez separacije biomase. Solid-state tehnika kultivacije, odnosno gajenje mikroorganizama na čvrstim hranljivim podlogama podrazumeva njihov rast na čvrstoj podlozi u odsustvu slobodne vode. Ona se primenjuje za mali broj mikroorganizama, najčešće kvasaca i plesni (Knežević-Jugović, 2008).

Solid-state tehnika kultivacije, kao i sve druge tehnike ima čitav niz prednosti i nedostataka (Pejin, 2003) i njeno poređenje sa submerznom tehnikom je prikazano u tabeli 3.4 (Ray i Behera, 2017).

Prednosti solid-state tehnike kultivacije:

- relativno je otporna na bakterijsku kontaminaciju, usled ograničenosti njihovog rasta niskim sadržajem vode,
- punjenje bioreaktora hranljivom podlogom je više nego kod submerzne, zbog nižeg sadržaja vlage u čvrstim podlogama,
- proizvodi se uspešno mogu izdvajati ekstrakcijom pri čemu je potrebno znatno manje rastvarača nego kod proizvoda submerzne kultivacije,
- jednostavna obrada ostataka kultivacije koji se usled niskog sadržaja vode mogu ekonomično sušiti i koristiti kao stočna hrana ili đubrivo,
- aeracija je ekonomičnija jer zahteva manji utrošak energije za pripremu vazduha,
- konidiospore se mogu koristiti kao inokulum.

Nedostaci solid-state tehnike kultivacije:

- mešanje hranljive podloge je otežano što za posledicu ima neravnomernu raspodelu ćelija mikroorganizama, hranljivih materija, vlage i dr, usled čega nije moguće izvršiti složenu procesnu kontrolu,
- teško izvodljiva kontrola temperature jer se tokom bioprocesa oslobađa toplota usled čega se povećava temperatura; u ovom slučaju kontrolisanje temperature je moguće intenzivnom aeracijom,
- određivanje rasta mikroorganizama i drugih parametara je otežano jer ne postoje adekvatni senzori,
- može se primeniti relativno mali broj mikroorganizama zbog niskog sadržaja vlage,
- nije moguće analizirati uslove kultivacije, ne može se izvoditi kontinualno i teško se može automatizovati,
- unapređenje ovih bioprocesa se zaniva na eksperimentalnim rezultatima i iskustvu onih koji ih izvode.

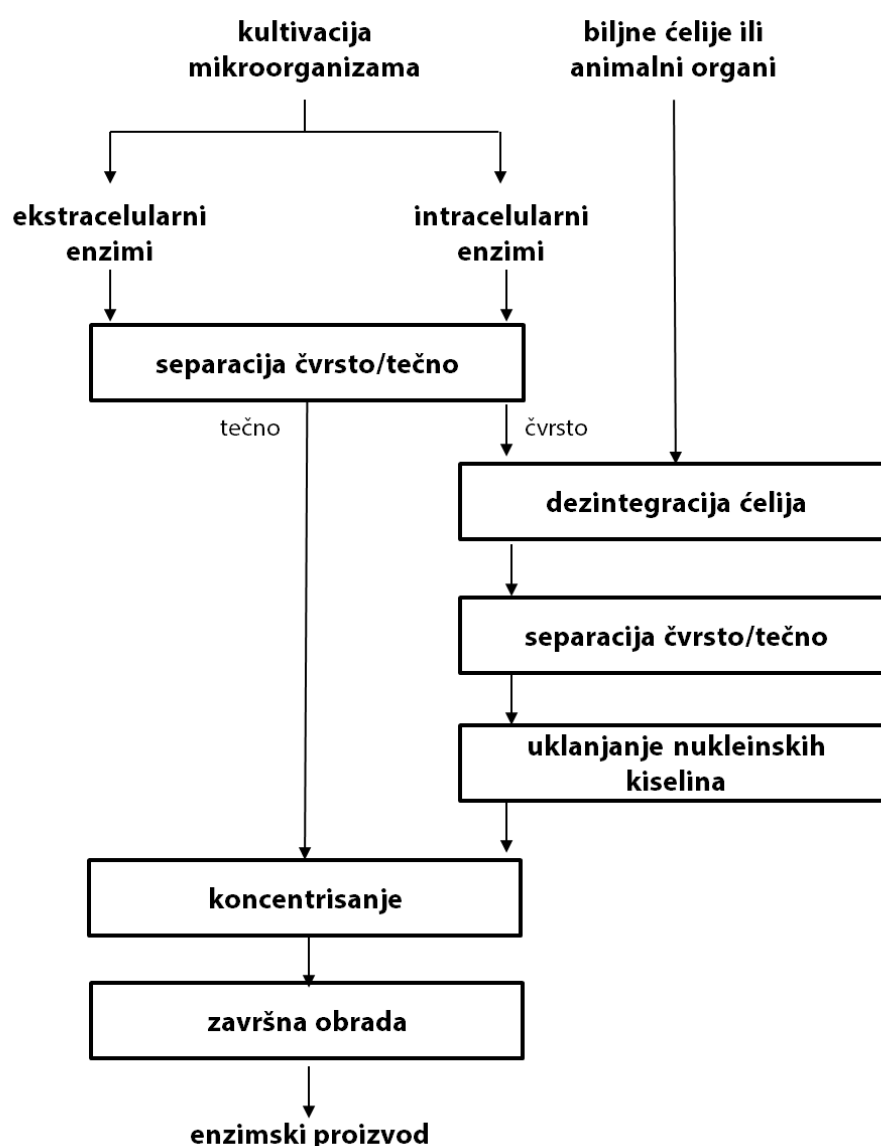
Tabela 3.4. Poređenje između submerzne i solid-state tehnike

SUBMERZNA TEHNIKA KULTIVACIJE	SOLID-STATE TEHNIKA KULTIVACIJE
Koristi kompaktne i zatvorene bioreaktore	Zahteva dosta prostora i velike površine za tave
Zahteva minimalnu radnu snagu	Zahteva značajnu radnu snagu
Potrebna je značajna količina energije za aeraciju i mešanje	Potrebne su male količine energije
Zahteva kontrolu uslova kultivacije	Potrebna je minimalna kontrola
Potrebne su različite tehnike separacije	Izdvajanje nije zahtevno

Na sintezu enzima tokom solid-state kultivacije mikroorganizama utiču brojni faktori među kojima su odabir odgovarajućeg supstrata i proizvodnog mikroorganizma, predtretman supstrata, veličina čestica supstrata, sadržaj vode i a_w vrednost supstrata, relativna vlažnost, vrsta i veličina inokuluma, kontrola temperature/uklanjanje metaboličke toplote, vreme kultivacije, održavanje uniformnosti uslova u solid-state sistemu, gasna atmosfera odnosno brzina potrošnje kiseonika i brzina nastajanja ugljen-dioksida (Patel i sar., 2017). Solid-state je ekološki prihvatljiva tehnika koja ima brojne prednosti, kao što su sprečavanje zagađenja životne sredine i akumuliranja različitog agroindustrijskog otpada. Kod solid-state kultivacije različiti agroindustrijski ostaci se koriste kao čvrsta podloga i predstavljaju i izvore ugljenika i energije za primenjeni proizvodni mikroorganizam. Smatra se da je ova tehnika pogodnija za određene mikroorganizme, kakve su filamentozne plesni, jer čvrsta hranljiva podloga simulira uslove iz njihovog prirodnog staništa (Ray i Behera, 2017).

3.3.4. IZDVAJANJE I PREČIŠĆAVANJE ENZIMA

Izdvajanje i prečišćavanje enzima je veoma skup i složen proces, usled čega se enzimski preparati upotrebljavaju u neprečišćenom obliku kada god za to postoji mogućnost (Dodić i Grahovac, 2013). Opšta šema procesa izdvajanja i prečišćavanja enzima do gotovog enzimskog preparata je prikazana na slici 3.4 (Yoo i sar., 2017). Prvi korak prilikom izdvajanja enzima jeste ekstrakcija iz njihovog biološkog izvora. Svaka ekstrakcija ili bilo koja operacija prečišćavanja utiče na povećanje ukupne cene proizvodnje, ali i na smanjenje prinosa enzima. Specifična aktivnost enzima se može povećati uvođenjem dodatnih operacija prečišćavanja, ali to stvara dodatne troškove i poskupljuje proizvodnju.



Slika 3.4. Opšta šema izdvajanja i prečišćavanja enzima

Održavanje maksimalne aktivnosti enzima ima veliki značaj tokom procesa izdvajanja enzimskog preparata i faktori koji utiču na smanjenje enzimske aktivnosti su temperatura, vrednost pH, oksidacija i gubitak kofaktora. Najznačajniji među njima je verovatno inaktivacija toplotom koja se dešava kada je loše hlađenje tokom ekstrakcije i prečišćavanja. U početnim fazama ekstrakcije može doći do proteolize proteazama koje su još uvek prisutne (Yoo i sar., 2017). Enzimi odnosno enzimski preparati se mogu izdvojiti iz kultivacione tečnosti, biomase proizvodnog mikroorganizma ili iz vodenog ekstrakta kultura sa čvrstih hranljivih podloga. Izdvajanje i prečišćavanje enzima proizvedenih submerznom i solid-state kultivacijom se razlikuje u nekoliko operacija. Dobijanje čistih enzimskih preparata je donekle jednostavnije iz submerzne kultivacione tečnosti, međutim u ovom slučaju se enzimi izdvajaju iz razblaženih rastvora (Dodić i Grahovac, 2013). Enzimi koji se proizvode ekstracelularno se ponekad koriste bez izdvajanja i prečišćavanja. Sa druge strane razaranje ćelija je neophodno za oslobađanje intracelularnih enzima u okolni rastvor pre njegovog daljeg prečišćavanja. Seperacija čvrsto-tečno je neophodna za odvajanje ćelija ili ostataka ćelija nakon njihovog razaranja. Intracelularni enzimi mogu sadržati nukleinske kiseline čije prisustvo negativno utiče na prečišćavanje enzima usled povećanja viskoznosti. One moraju biti uklonjene dodatkom nukleaza ili precipitacijom (Yoo i sar., 2017). Dalje prečišćavanje zavisi od osobina enzima pri čemu se mogu koristiti različite metode: dijaliza, koncentrisanje uparavanjem, gel filtracija, taloženje organskim rastvaračima, afinitetna hromatografija, imobilizacija, sušenje termolabilnih materija (Pejin D., 2003).

3.3.5. PRIMENA ENZIMA

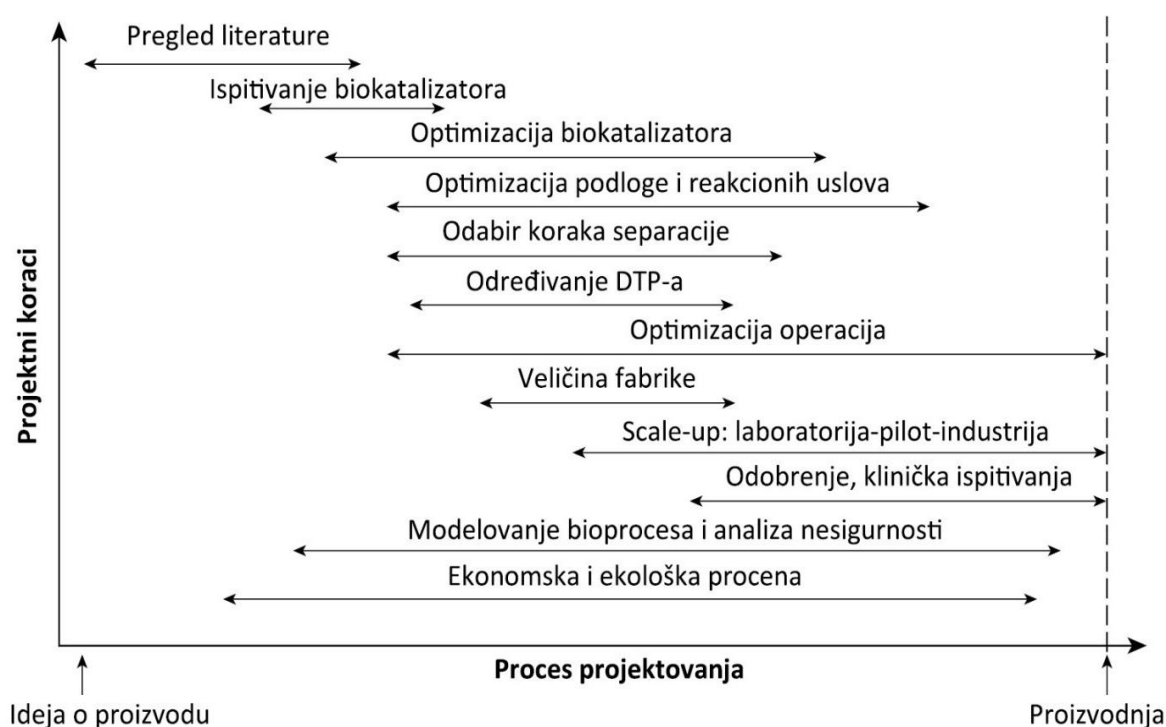
Hidrolaze predstavljaju skoro 85% industrijskih enzima, a predstavljaju enzime koji se koriste za razgradnju prirodnih supstrata kao što su proteini, škrob, lignocelulozni materijal i dr. Oni ne zahtevaju prisustvo skupih kofaktora što je i osnovni razlog za njihovu široku industrijsku primenu. Proteaze su dominantne, čine oko 60% industrijskih enzima, a najviše se koriste u prehrambenoj industriji za proizvodnju mlečnih proizvoda i razmekšavanje mesa, pekarstvu, pivarstvu i u industriji kože i deterdženata. Amilaze su druga po važnosti grupa industrijskih enzima (28%) i imaju primenu u pekarstvu, pivarstvu, industriji škroba i tekstila. Ostale hidrolaze koje imaju specifičnu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji su lipaze, esteraze, pektinaze, celulaze, hemicelulaze, laktaze, fitaze, penicilin-acilaze, aminoacilaze i drugi enzimi. Enzimi iz ostalih grupa imaju veoma malu komercijalnu primenu zato što se još uvek ne proizvode na ekonomičan način u dovoljnim količinama i zato što je za njihovu aktivnost potrebno prisustvo skupih koenzima i drugih kofaktora. U industrijskim enzimskim procesima koristi se relativno mali broj enzima, oko 50 od nekoliko 1000, dok se enzimi koji se koriste u analitičke, dijagnostičke i terapijske svrhe još uvek ne mogu proizvesti u dovoljnim količinama (Knežević-Jugović, 2008). U tabeli 3.5 prikazana je primena enzima u značajnim granama industrije (Singhania i sar., 2010).

Tabela 3.5. Primena različitih enzima u značajnim granama industrije

INDUSTRIJA PROIZVODNJA	ENZIM	PRIMENA/FUNKCIJA/ULOGA
Deterdženata	Proteaze	Uklanjanje proteinskih mrlja degradacijom
	Celulaze	Slabljenje celuloznih vlakana kako bi se lakše uklonila prljavština i prosvetljavanje boja
	Lipaze	Uklanjanje masnih mrlja degradacijom
Papira i pulpe	Ksilanaze	Bio-izbeljivanje
	Celulaze	Uklanjanje mastila sa papira za recikliranje
	Lakaze i peroksidaze	Polimerizacija materijala sa vlaknima na bazi drveta
Tekstila	Celulaze	Bio-izbeljivanje teksas platna i bio-poliranje
	Katalaze	Čišćenje izbeljivača
Kože	Proteaze i lipaze	Natapanje, omekšavanje i uklanjanje dlaka sa kože životinja
Hrane za životinje	Fitaze	Otpuštanje fosfata
	Ksilanaze	Rastvaranje vlakana
Skroba	α - i β -amilaze, pululanaze, invertaze, glukoza-izomeraze	Proizvodnja raznih vrsta sirupa od skroba i saharoze
	Glukoza-oksidaze	Povećanje roka trajanja hrane uklanjanjem kiseonika i glukoze
Voćnog soka	Celulaze, ksilanaze, pektinaze	Bistrenje i ekstrakcija soka
Pekarskih proizvoda	Ksilanaze	Kondicioniranje testa
	α -amilaze	Veličina vekne, rok trajanja
	Glukoza-oksidaze	Kvalitet testa
Mlečnih proizvoda	Renin	Zgrušavanje proteina
	Laktaze	Hidroliza laktoze
	Proteaze i lipaze	Sazrevanje sira
Piva	Glukanaze	Pomoćno sredstvo u filtraciji
	Papain	Kontrola bistrine
Biogoriva	Celulaze i β -glukozidaze	Hidroliza celulozne biomase radi stvaranja glukoze
	Ksilanaze	Hidroliza hemiceluloze radi stvaranja pentoza
Proizvoda za ličnu upotrebu	Proteinaze i lipaze	Čišćenje kontaktnih sočiva
	Glukoza-amilaze	Oslobađanje glukoze iz oligomera na bazi skroba
	Glukoza-oksidaze	U pasti za zube za konverziju glukoze u glukonsku kiselinu i vodonik peroksid koji služe kao dezinfekciono sredstvo

3.4. PROJEKTOVANJE BIOPROCESA: MODELOVANJE I SIMULACIJA

Projektovanje bioprocasa predstavlja kompromis između tehničko-tehnoloških mogućnosti, ekonomskih efekata i zaštite životne sredine. Dobro definisan raspored za istraživanje i razvoj, osnova su svakog procesa projektovanja, jer pomaže u smanjenju vremena projektovanja, a povećava šanse za nastanak ekološki bezbednog bioprocasa koji se može realizovati u industrijskim razmerama. Projektovanje bioprocasa obuhvata različite korake koji su prikazani na slici 3.5. Analizom koraka koji se odvijaju tokom procesa projektovanja, sagledava se njegova kompleksnost, s obzirom da više koraka teku paralelno i utiču jedni na druge.



Slika 3.5. Proces projektovanja i koraci koje obuhvata DTP – dijagram toka procesa

Prvi korak, nakon jasnog definisanja i određivanja proizvoda je detaljan pregled naučne i stručne literature, kojim se dobijaju podaci o mogućem postojanju sličnog proizvoda na tržištu, da li je potrebna tehnologija proizvodnje patentirana i sl., a takođe se pronalaze podaci o adekvatnom biokatalizatoru, procesu proizvodnje, kao i postupcima izdvajanja i prečišćavanja.

Nakon pronalaska odgovarajućeg biokatalizatora, koji ima glavnu ulogu u bioprocasa, sledi njegovo ispitivanje i optimizacija. Uporedo sa optimizacijom biokatalizatora, vrši se i optimizacija podloge i procesnih parametara.

Nakon toga potrebno je odabrati odgovarajuće korake izdvajanja i prečišćavanja i definisati dijagram toka procesa koji obuhvata operacije za pripremu i sterilizaciju podloge, sam bioproces i separacione tehnike.

Prilikom projektovanja i povećanja razmera procesa, dijagram toka procesa se menja jer se ispituju različite alternative, pri čemu se svaka operacija optimizuje sa ciljem dobijanja maksimalno moguće količine proizvoda. Tokom povećanja razmera, odnosno scale up-a definiše se veličina postrojenja, a takođe se proverava veličina tržišta i udeo proizvoda na istom, a koja je procenjena na početku projektovanja. Prvi dobijeni podaci o bioprocesu koriste se za njegovo modelovanje, što ima za cilj proračun materijalnih bilansa, potrošnje energije, potrebne radne snage kao i opreme za proces proizvodnje.

Prilikom projektovanja bioprocesa neophodni su mnogobrojni učesnici i njihova interakcija. To su specijalisti iz oblasti biohemije, molekularne biologije, genetičkog inženjerstva, zatim procesni, biohemijski inženjeri, kao i stručnjaci ekologije. Važnu ulogu ima i tim za marketing, tim za patente, kao i pravni tim. Značajni alati prilikom projektovanja su modelovanje bioprocesa i analiza troškova, koji delimično treba da budu primenjeni od strane projektanta bioprocesa, ali često je neophodna saradnja različitih stručnjaka (Vučurović i sar., 2012).

3.4.1. MODELOVANJE I SIMULACIJA BIOPROCESA

Modelovanje predstavlja matematički opis, odnosno definisanje bioprocesa matematičkim jednačinama, dok simulacija predstavlja rešavanje jednačina modela. Modelovanje se odvija u više koraka i oni su (Vučurović, 2015):

- **definisanje cilja i granice modela** – što podrazumeva specifikaciju proizvoda, biokatalizator, veličinu postrojenja (koja ima uticaj na troškove bioprocesa) i granice modela;
- **prikupljanje podataka** – za ovaj korak mogu poslužiti podaci iz sopstvenih ispitivanja, sva dostupna literatura, patentni kao i mišljenje stručnjaka. Načelno vrednosti parametara se uzimaju iz različitih izvora ili se vrši njihova ekstrapolacija iz uslova koji se razlikuju od sopstvenih;
- **postavljanje modela bioprocesa** – započinje sa bioreakcijom, na osnovu prikupljenih podataka izvode se reakcione jednačine i uslovi. Prvo se navode sirovine, a potom određuju parametri (prinos, vreme trajanja, koncentracija proizvoda, itd.). Takođe, neophodno je definisati reakcione uslove modela;
- **definisanje dijagrama toka i operacija (DTB)** – sve procedure i koraci postaju određeni, svaka operacija mora biti opisana u modelu i parametri definisani;
- **sakupljanje dokumentacije** – sve pretpostavke, pojednostavljenja i procene se moraju dokumentovati u pisanom obliku, a takođe potrebno je priložiti i objašnjenje zašto su konkretne vrednosti korišćene.

Kada je model konačno napravljen prenosi se u adekvatan simulacioni softver na osnovu čijih rezultata se poboljšava razumevanje samog bioprocasa, procenjuje održivost i izvodi optimizacija (Vučurović, 2015). Matematički model je opis dela realnog, stvarnog stanja, a primenom modela, kroz simulaciju, dobijaju se podaci o stvarnosti koji se mogu primeniti u različite svrhe (Marić i Šantek, 2009). Modelovanje i simulacija bioprocasa poboljšavaju uvid i razumevanje bioprocasa, ukazuju na potencijalna poboljšanja ili poteškoće. Prilikom projektovanja bioprocasa i njegovog prevođenja u industrijske razmere, simulacija može da zameni eksperimente, kako bi se proširila osnova za donošenje odluka (Hainzle i sar., 2006; Sokolowski i Banks, 2009).

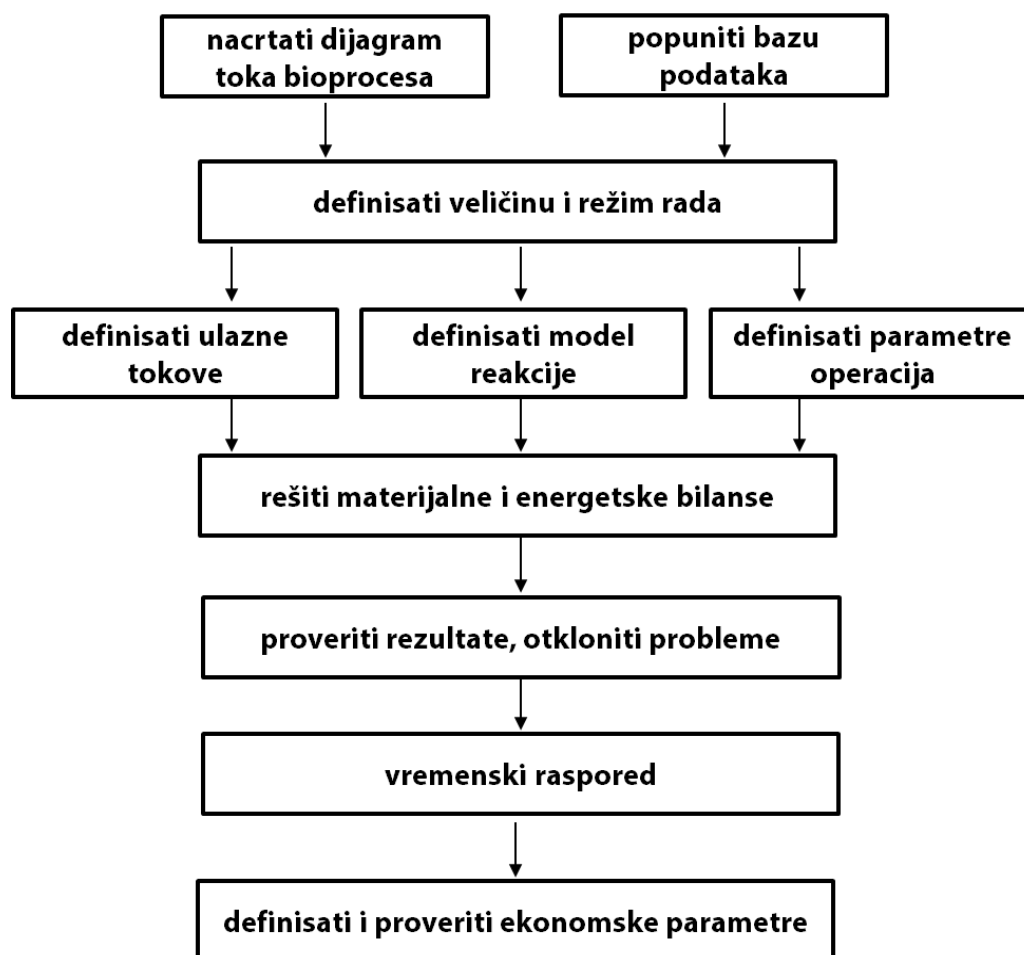
Za simulaciju bioprocasa proizvodnje hidrolitičkih enzima u ovoj disertaciji se koristi softver SuperPro Designer™ (Intelligen Inc. Nju Džersi, SAD). Pregled koraka za rešavanje modela u softveru za simulaciju bioprocasa su prikazani na slici 3.6.

Softver SuperPro Designer™ je korišćen za simulaciju različitih bioprocasa, kao što su proizvodnja biogasa (Vo i sar., 2018; Mel i sar., 2015), bioetanola (Barrera i sar., 2016; Mupondwa i sar., 2018), mlečne kiseline (Kwan i sar., 2018), sukcininske kiseline (Lam i sar., 2014), i mnogih drugih bioprocasa.

Početak simulacije je formiranje dijagrama toka bioprocasa na radnoj površini simulatora postepenim dodavanjem procedura i njihovim povezivanjem ulaznim tokovima, a potom i definisanjem izlaznih tokova. Baza podataka koja sadrži materijale koji ulaze u bioprocasa kao i sve materijale koji nastaju tokom procesa, sastavlja se pre početka modelovanja pojedinačnih jedinica. Naredni korak je određivanje dijagrama toka bioprocasa i svih operacija koje obuhvata. Pre specifikacije ulaznih tokova i jedinica modela potrebno je odrediti veličinu bioprocasa. Potom se deo modela u kome se prva procedura i njeni tokovi crtaju i specifikuju analizira, sve dok se ne isprave greške. Zatim se dodaje sledeći procesni korak i specifikuje, pri čemu se za svaki korak moraju definisati tokovi koji ulaze u bioprocasa, a potom se podešava njegov sastav i definiše ukupna masa ili zapremina. Ovim postupkom, definisanjem veličine toka, određuje se veličina opreme.

Za većinu operacija bioprocasa softver sadrži unapred definisane modele i samo se parametri moraju definisati. Vrednosti parametara se definišu na osnovu sakupljenih podataka, a program sadrži uobičajene vrednosti, koje predstavljaju srednje vrednosti za procedure i pogodne su za primenu u početnim fazama projektovanja, dok se u detaljno opisanom modelu ne preporučuje njihova primena. Od složenosti operacije zavisi i broj potrebnih parametara. U bioreakcionom koraku reakciona jednačina se definiše na bazi mase ili mola, kako bi se objasnio nestanak reaktanata i nastanak glavnog i sporednih proizvoda.

Za optimalnu proizvodnju i ekonomski isplativ bioproces neophodan je efikasan vremenski raspored, mada se tokom procesa modelovanja ne preporučuje previše obraćanja pažnje na vremenski raspored, sve dok svaka operacija u diskontinualnom postupku ne predstavlja pojedinačnu radnu jedinicu. Nakon toga model se može proširiti na željeni broj jedinica opreme.



Slika 3.6. Koraci rešavanja modela pri simulaciji

U programu su unapred definisane i različite vrste komunalnih usluga, potrošnih materijala, kao i količina radne snage potrebna za svaku operaciju. Proces modelovanja je visokoiterativan i najčešće je neophodno dosta ispravki tokom podešavanja modela. Kada je tehnički model proveren, podešavaju se ekonomski parametri bioprocasa i modela, pri čemu softver sadrži osnovne informacije o cenama i komplet alata za ekonomsku procenu. Ekonomski model takođe mora biti proveren.

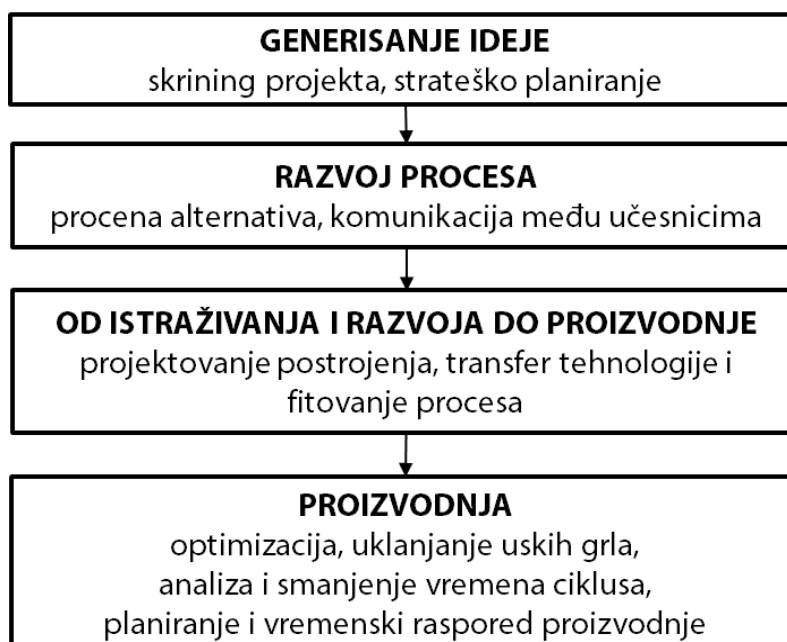
Za realnu procenu projekta neophodno je razumevanje nesigurnosti bioprocesa, odnosno potrebna je identifikacija i kvantifikacija rizika i mogućnosti unutar bioprocesa. Uticaj mogućih promena u bioprocusu, predpostavke i procene napravljene pomoću modelovanja, proveravaju se analizom nesigurnosti. Prilikom razmatranja samog termina „nesigurnosti“ važno je napraviti razliku između varijabilnosti i nesigurnosti. Varijabilnost se ne može umanjiti daljim ispitivanjima i ona je unutrašnja odlika sistema. Nesigurnost je posledica nedostatka znanja o nekom parametru. Nesigurnost koja utiče na bioprocus uključuje varijaciju u samom bioprocusu, kao i u lancu snabdevanja i tržištu proizvoda. Pored toga, postoje nesigurnosti u društvenom i političkom okruženju, gde se realizuje bioprocus. Parameter koji će se upotrebiti kao ciljane funkcije za opis uticaja nesigurnosti je potrebno definisati pre početka analize i najčešće se uzima neki parameter koji opisuje tehnički uticaj bioprocesa (Vučurović, 2015; Vučurović i sar., 2012).

3.4.2. ZNAČAJ PRIMENE SIMULATORA BIOPROCESA

Korisnost upotrebe procesnih simulatora zavisi od tipa proizvoda, faze razvoja i veličine investicije. Za biološke proizvode, kao sto su biogoriva, primarnu korist predstavlja minimizacija kapitala i operativnih troškova. Za visokovredne biofarmaceutske proizvode, glavna motivacija je sistematsko razvijanje procesa koje smanjuje količinu vremena potrebnu da bi se proizvod komercijalizovao. Na slici 3.7 dat je prikaz benefita upotrebe takvih alata u raznim fazama procesa komercijalizacije.

Generisanje ideja - Kada se proizvod i procesne ideje prvo osmisle, alati za modelovanje procesa se koriste za proveru, odabir i strateško planiranje procesa na osnovu preliminarnih ekonomskih analiza.

Razvoj procesa - Tokom ove faze, istraživači za razvoj procesa razmatraju različite opcije sinteze, prečišćavanja, karakterizacije i formulacije konačnog proizvoda. Proces prolazi kroz stalne promene tokom razvoja. Najčešće je veliki broj naučnika i inženjera uključen u poboljšanje i optimizaciju individualnih procesnih koraka. Upotreba procesnih simulatora u ovoj fazi može da uvede zajednicki jezik komunikacije i olakša timske interakcije kod razvoja procesa. Uticaj promena u procesu se jasno može evaluirati i sistematski dokumentovati. Kada pouzdan model postane dostupan, može da se koristi za nalaženje ekonomski najkritičnije oblasti kompleksnog procesa. Rezultati takvih analiza mogu da usmere dalja istraživanja u laboratoriji ili pilot postrojenju prema tim delovima procesa i njihovoj optimizaciji. Simulator takođe može da se primeni za evaluaciju ekoloških uticaja procesa. Ekološki problemi koji se zapostave tokom razvoja procesa mogu dovesti do ozbiljnih problema tokom proizvodnje.



Slika 3.7. Benefiti upotrebe procesnih simulatora

Projektovanje i selekcija postrojenja - Kada se razvoj procesa približava kraju na nivou pilot postrojenja, simulacioni alati se koriste za projektovanje i optimizaciju procesa za komercijalnu proizvodnju. Dostupnost dobrog kompjuterskog modela može znatno da olakša prevođenje novog procesa iz pilot postrojenja u industrijsko postrojenje. Ukoliko je potrebna izgradnja novog postrojenja, procesni simulatori mogu da odrede veličinu opreme i pomoćnih postrojenja, kao i da procene potrebno kapitalno ulaganje. Kada je reč o prevođenju proizvodnje u postojeća proizvodna postrojenja (transfer tehnologije), procesni simulatori mogu da se koriste za evaluaciju različitih proizvodnih lokacija sa stanovišta kapaciteta i troškova, na osnovu čega se lako može odabrati najprikladnija opcija.

Proizvodnja - Kod proizvodnje u velikim razmerama simulacioni alati se najčešće koriste za optimizaciju tokom izvođenja procesa i za uklanjanja uskih grla. Takođe, alati koji imaju mogućnost pravljenja vremenskog rasporeda procesa mogu da se koriste za generisanje proizvodnih rasporeda (Harrison i sar., 2015).

4. MATERIЈAL I METODE

4.1. MATERIJALI

4.1.1. PROIZVODNI MIKROORGANIZMI

Za ispitivanje proizvodnje celulolitičkih, amilolitičkih i ksilolitičkih enzima upotrebljeni su sojevi plesni *Trichoderma reesei* QM 9414, *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp, koji se čuvaju u zbirci kultura na predmetu Industrijska mikrobiologija, Tehnološkog fakulteta Novi Sad.

Inokulacija hranljivih podloga vršena je unapred pripremljenom suspenzijom spora u sterilnom fiziološkom rastvoru koja sadrži 10^6 spora/g. Za potrebe inicijalnih ispitivanja, odnosno odabira proizvodnog soja, u tečne podloge je dodavano 10% inokuluma, a po čvrstim je vršeno raspršivanje određene zapremine pripreljene suspenzije spora po njihovoj površini.

4.1.2. HRANLJIVE PODLOGE

Osvežavanje kultura plesni je vršeno na krompir dekstroznom kosom agaru inkubacijom 3-4 dana na 28°C.

Za potrebe istraživanja, nusproizvod prerade žita (pšenična plevica) upotrebljen je za pripremu hranljivih podloga. Data sirovina je dobijena iz domaće fabrike za preradu žita (mlina) „Žitopromet – Mlin“ a.d. Senta.

Sastav tečnih podloga za submerznu tehniku kultivacije na podlozi sa pšeničnom plevicom sa ciljem odabira proizvodnog soja i optimizaciju procesnih parametara je bio 3 g pšenične plevice, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 1,36% K_2HPO_4 u 100 mL destilovane vode.

Za kultivaciju na čvrstim podlogama sa ciljem odabira proizvodnog soja i optimizaciju procesnih parametara potrebna količina sirovine (3 g) suspendovana je u 100 mL česmenske vode, pa je nakon 15 min mešanja proverena i korigovana vrednost pH. Nakon dodatnih 15 min mešanja suspenzija je ostavljena da miruje kako bi se čvrsta faza istaložila u gravitacionom polju. Tečna faza je dekantovana, a talog upotrebljen kao čvrsta podloga za proizvodnju enzima. Na ovaj način proizvedeni enzimi nastaju iz iste količine sirovine (3 g pšenične plevice), kao i iste metode pripreme (100 mL rastvora soli u destiovanoj vodi), kako bi rezultati bili uporedivi, a prema uputstvu Hansen i sar. (2015).

Vrednost pH primenjenih hranljivih podloga korigovana je na $4,5\pm 0,1$ primenom 1% NaOH ili 1% H_2SO_4 . Za potrebe optimizacije vrednost pH je podešena u opsegu 4-6. Sterilizacija pripremljenih hranljivih podloga je izvedena u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i pritisku od 2,1 bar u trajanju od 20 min.

4.2. METODE

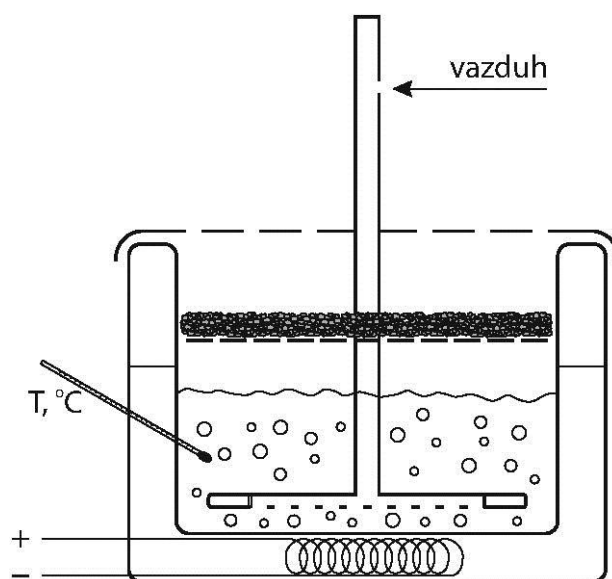
4.2.1. TOK KULTIVACIJE

Proizvodnja enzima submerznom i solid-state tehnikom kultivacije plesni sa ciljem odabira proizvodnog soja ispitana je u erlenmajerima od 300 ml sa 100 ml tečne hranljive podloge ili čvrtom hranljivom podlogom koja je zaostala nakon dekantovanja tečne faze, i koja je inokulisana sporama plesni. Ogledi proizvodnje enzima submerznom tehnikom izvedeni su u trajanju od 7 dana na temperaturi od $28\pm 1^\circ C$. Za potrebe optimizacije temperatura kultivacije je varirana u opsegu $25-35^\circ C$ a vreme kultivacije u opsegu 3-7 dana.



Slika 4.1. Laboratorijski bioreaktor BIostat A-Plus

Eksperimenti sa ciljem ispitivanja toka kultivacije i validacije procesa optimizacije u submerznim uslovima su izvedeni u laboratorijskom bioreaktoru (BIOSTAT A-Plus, Sartorius AG, Goettingen, Germany) ukupne zapremine 3 L (radne zapremine 2 L) sa automatskim merenjem i regulacijom procesnih parametara (slika 4.1). Kultivacija plesni na čvrstim hranljivim podlogama sa ciljem ispitivanja toka kultivacije i validacije procesa optimizacije izvedena je u solid-state bioreaktoru prikazanom na slici 4.2. Inokulisana čvrsta hranljiva podloga je postavljena na perforiranu stalažu, aerisana i vlažena barbotiranjem, odnosno produvanjem temperiranog vazduha kroz destilovanu vodu smeštenu ispod perforirane površine. Regulacija temperature vršena je zagrevanjem destilovane vode pomoću grejača koji je smešten u omotaču suda.



Slika 4.2. Laboratorijski solid-state bioreaktor

4.2.2. ANALITIČKE METODE

Analiza kvaliteta sirovine. Analiza primenjene sirovine (pšenične plevice) je izvršena u skladu sa uobičajenom praksom laboratorijske kontrole Nacionalne laboratorije za obnovljive energije u Vašingtonu, Amerika (National Renewable Energy Laboratory – NREL/TP-510-48087, 2010).

Sadržaj suve materije (SM) primenjenih sirovina određene je gravimetrijski (NREL/TP-510-42621, 2008).

Sadržaj ugljenih hidrata (celuloze, hemiceluloze, skroba, saharoze i drugih redukujućih šećera) i lignina određene je primenom visokopritisne tečne hromatografije (HPLC – High Pressure Liquid Chromatography) i spektrofotometrijski, redosledom (NREL/TP-510-42618, 2010).

Sadržaj pepela određen je gravimetrijskom metodom (NREL/TP-51-42622, 2008).

Sadržaj ukupnog azota u primenjenim sirovinama je određivan metodom po Kjeldahl-u (NREL/TP-510-42625).

Analiza uzoraka kultivacije. Nakon kultivacije na čvrstim podlogama ekstrahovani su proizvodi metabolizma sa 100 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 5,0) uz konstantno mešanje pri 200 o/min, u trajanju od 30 min na konstantnoj temperaturi, kako bi se izjednačila zapremina za submerznim kultivacionim tečnostima (Hansen i sar., 2015). Što se tiče uzoraka prilikom ispitivanja toka kultivacije, masa uzorka čvrste podloge je izmerena na analitičkoj vagi, a dodata zapremina acetatnog pufera proporcionalna da se izjednači sa tečnom hranljivom podlogom (Hansen i sar., 2015) kako bi rezultati bili uporedivi.

Razdvajanje čvrste i tečne faze nakon ekstrakcije iz čvrstih podloga kao i submerzne kultivacije plesni izvršeno je filtracijom kroz kvalitativnu filter hartiju. Dobijeni filtrati podvrgnuti su standardnoj analizi uzoraka fermentacione tečnosti.

Ukupan sadržaj proteina u fermentacionim tečnostima ili ekstraktima čvrste podloge na kraju procesa određivan je spektrofotometrijski metodom po Lowry-u (1951) u kojoj su kao reagensi korišćeni bakar-sulfat u rastvoru alkalnog tartarata i Folin-Ciocalteu-ovog rastvora, a apsorbancija je očitavana na 660 nm.

Intenzitet hidrolitičkog delovanja, odnosno aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza u fermentacionim tečnostima i ekstraktima čvrstih podloga prema skrobu, celulozi i ksilanu određen je na osnovu sadržaja redukujućih šećera koji ovim procesom nastaju i koji se određuju spektrofotometrijskom metodom po Miller-u (1959). Kao reagens koristi se dinitrosalicilna kiselina (DNS), a apsorbancija se očitava na 540 nm. Jedna jedinica (U) enzimske aktivnost (amilaze, celulaze i ksilanaze) je definisana kao količina enzima koja oslobodi 1 μ mol redukujućih šećera u obliku glukoze/mL·min pod odgovarajućih uslovima analize (Ji i sar., 2018).

Supstrat za procenu aktivnosti amilaza je 1% rastvor rasvorljivog skroba u destilovanoj vodi. Potpuno rastvaranje skroba se postiže kivanjem ovog rastvora u ključalom vodenom kupatilu. Rastvor skroba se meša sa tečnom fazom fermentacione tečnosti ili ekstraktom čvrste podloge u odnosu 3:1. Za slepu probu koristi se destilovana voda. Nakon homogenizacije, hidroliza se vrši u toku 30 minuta na 37°C u temperiranom vodenom kupatilu.

Supstrat za procenu aktivnosti celulaza je 1% rastvor rastvorljive karboksimetilceluloze u 0,1 M acetatnom puferu čija je vrednost pH 5,5. Potpuno rastvaranje karboksimetilceluloze se postiže kivanjem ovog rastvora u ključalom vodenom kupatilu. Rastvor karboksimetilceluloze se meša sa tečnom fazom fermentacione tečnosti ili ekstraktom čvrste podloge u odnosu 3:1. Za slepu probu se meša 0,1 M acetatni pufer čija je vrednost pH 5,5.

Nakon homogenizacije, hidroliza se vrši u toku 30 minuta na 45°C u temperiranom vodenom kupatilu.

Supstrat za procenu aktivnosti ksilanaza je 1% rastvor ksilana u 0,05 M acetatnom puferu čija je vrednost pH 4,5. Potpuno rastvaranje ksilana se postiže kuvanjem ovog rastvora u ključalom vodenom kupatilu. Rastvor karboksimetilceluloze se meša sa tečnom fazom fermentacione tečnosti ili ekstraktom čvrste podloge u odnosu 3:1. Za slepu probu se meša 0,05 M acetatni pufer čija je vrednost pH 4,5. Nakon homogenizacije, hidroliza se vrši u toku 60 minuta na 45°C u temperiranom vodenom kupatilu.

4.2.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Svi rezultati prikazani u ovom radu predstavljaju srednje vrednosti iz tri eksperimenta ponovljena pod istim uslovima. Rezultati su statistički obrađeni analizom varijanse pri stepenu značajnosti $\alpha=0,05$. Adekvatnost modela je procenjena na osnovu koeficijenta determinacije (R^2) i p-vrednosti modela. Metoda funkcije odzivne površine je metoda modelovanja pogodna za proučavanje uticaja više faktora na odzive njihovim istovremenim variranjem uz izvođenje ograničenog broja eksperimenata. Upravo zato je ova metoda upotrebljena za optimizaciju uslova proizvodnje enzima submerznom i solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice. Za planiranje eksperimenata odabran je Box-Behnken-ov dijazn.

Za opis odzivne funkcije Y (ukupan sadržaj prioteina (mg/mL) i aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza (U/mL)), primenjen je polinom drugog reda:

$$Y = x + aA + bB + cC + a^2A^2 + b^2B^2 + c^2C^2 + abAB + acAC + bcBC$$

gde su: x - odsečak,

a, b i c - linearni koeficijenti,

a^2 , b^2 i c^2 - kvadratni koeficijenti i

ab, ac i bc - koeficijent interakcije.

Ispitivan je uticaj sledećih faktora u navedenim opsezima:

A: temperatura kultivacije (25-35°C),

B: vrednost pH (4-6) i

C: vreme kultivacije (3-7 dana).

Statistička obrada eksperimentalnih podataka i crtanje površina odziva je urađeno primenom softverskog paketa STATISTICA 12.0 (StatSoft, USA). Značajnost uticaja svakog od faktora kao i njihovih interakcija određivana je poređenjem p-vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Za optimizaciju faktora, primenjena je metoda željene (tražene) funkcije u softverskom paketu DESIGN-EXPERT 7.0 (StatEase, Inc., USA).

4.2.4. MODEL I SIMULACIJA BIOPROCESA

Softver za simulaciju bioprocasa je serija kompjuterskih algoritama sposobnih za matematičko modelovanje učinka individualnih operativnih jedinica, čija osnovna prednost jeste što se svi aspekti upravljanja procesa nalaze na jednom mestu i mogu se istovremeno ispitivati. Simulacije omogućavaju predviđanje različitih scenarija koji se mogu javiti tokom rada postrojenja, dok prilikom projektovanja bioprocasa i njegovog prevođenja u industrijske razmere, simulacija može da zameni eksperimente, kako bi se proširila osnova za donošenje odluka.

Za generisanje modela bioprocasa proizvodnje enzima iz nusproizvoda prerade šećerne žita upotrebljen je program SuperPro Designer® v9.0 (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ), odnosno program koji omogućava procenu kako procesnih tako i ekonomskih parametara datog bioprocasa.

Definisani su maseni i energetski bilansi čitavog postrojenja za proizvodnju enzima iz pšenične plevice, a na osnovu njih određeni ključni ekonomski parametric za isplativost ovog bioprocasa. Takođe, izvršena je analiza profitabilosti i analiza nesigurnosti, u zavisnosti od stanja sirovine na tržištu i kapaciteta proizvodnje.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Prvi deo ovog poglavlja prikazuje rezultate analize sastava nusproizvoda prerade pšenice (plevice) iz jednog domaćeg mlina, a koji je upotrebljen za formulaciju hranljivih podloga u daljim istraživanjima u okviru ovog rada. Drugi deo prikazuje ispitivanje mogućnosti i poređenje odabranih proizvodnih mikroorganizama, a ujedno i odabir najproduktivnijeg u smislu količine sintetisanih enzima i aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza. Odabrani soj je dalje upotrebljen za ispitivanje toka submerzne i solid-state kultivacije za proizvodnju hidrolitičkih enzima. U četvrtoj fazi istraživanja, izvedena je optimizacija bioprocesa kultivacije plesni u submerznim i solid-state uslovima na podlozi čiju osnovu čini pšenična plevica. Ispitan je uticaj značajnih faktora na modelovanje odabranih odziva: ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, aktivnost celulaza i aktivnost ksilanaza. Nakon toga je primenjena metoda željene funkcije i zajedno sa polinomskim zavisnostima posmatranih odziva upotrebljena za optimizaciju ispitanih procesnih parametara. Poslednji, šesti deo prikazuje primenu rezultata optimizacije i literaturnih podataka za definisanje idejnog rešenja modela postrojenja za proizvodnju hidrolitičkih enzima iz nusproizvoda prerade pšenice.

5.1. SASTAV SIROVINA

Pšenična plevica je suvo, lisnato zaštitno kućište koje okružuje zrelo seme pšenice. Prilikom prerade žita, u pripremnoj fazi (pre mlevenja), vrši se odvajanje svih primesa, među kojima je i plevica, a koje utiču na kvalitet gotovih proizvoda. Ovaj nusproizvod je zbog svoje strukture i ugljenohidratnog sastava do sada korišćen kao hrana za stoku (Mann i sar., 1988) ili kao sirovina za proizvodnju visoko vrednih proizvoda biotehnologije poput: polimera za biokompozite (Mamun i Al Bledzki, 2014), šećera za proizvodnju bioetanolu (Duguid i sar., 2007) i materijala za adsorpciju teških metala (Sud i sar., 2008). Plevica nije stalnog sastava. Sastav plevice varira od vrste useva, vlage, vremenskih uslova i kvaliteta žetve (Pastornjicki, 2011). Rezultati analize sastava pšenične plevice iz jedne domaće fabrike za preradu žita „Žitopromet – Mlin“ a.d. Senta su prikazani u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Prosečan sastav plevice iz domaće fabrike prerade žita

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Min	Max
Suva materija (% m/m)	91,1	4,6	86,5	95,7
Skrob (% SM)	1,5	0,2	1,3	1,7
Celuloza (% SM)	36,6	1,1	35,5	37,7
Hemiceluloza (% SM)	18,1	1,4	16,7	19,5
Lignin (% SM)	17,8	0,3	17,5	18,1
Protein (% SM)	4,6	1,7	2,9	6,3
Pepeo (% SM)	6,9	0,8	6,1	7,7

SM – suva materija; SV – srednja vrednost; SD – standardna devijacija

Visok sadržaj suve materije (preko 90%) ukazuje da mogućnost lakog skladištenja tokom dužeg vremenskog perioda, a sa druge strane pojednostavljuje proces jer nije potrebno dodatno sušenje pre skladištenja. Prisustvo ugljenih hidrata u velikom udelu u pšeničnoj plevici ukazuje na to da je ovaj agroindustrijski otpad veoma pogodna sirovina za proizvodnju enzima mikrobiološkom kultivacijom. Sa druge strane, visok sadržaj lignina čini ovu sirovinu veoma kompaktnom. Prosečan sastav pšenične plevice prema McCartney i sar. (2006) je celuloza 36-39%, hemiceluloza 18-21% i lignin 16%, što se slaže sa dobijenim rezultatima analize pšenične plevice sa našeg podneblja.

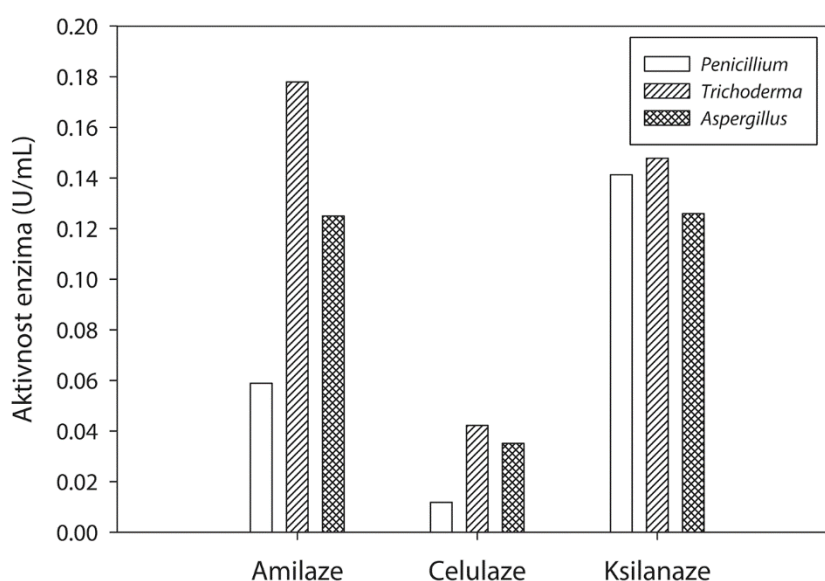
Iz rezultata analize sastava pšenične plevice može se zaključiti da je navedeni nusproizvod prerade žita uobičajenog sastava za ovu vrstu prerade. Na osnovu ove analize, pomenuti otpad, može biti pogodna sirovina za pripremu hranjive podloge za proizvodnju enzima.

5.2. ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI I ODABIR PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA ZA PROIZVODNJU ENZIMA PRIMENOM SUBMERZNE I SOLID-STATE TEHNIKE KULTIVACIJE

Kultivacija plesni *Trichoderma reesei*, *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. na pšeničnoj plevici je ispitana sa ciljem utvrđivanja mogućnosti proizvodnje enzima iz ovih sirovina i definisanja najpogodnijeg proizvodnog mikroorganizma za ovu biosintezu. Kultivacija na ovoj hranljivoj podlozi je izvedena primenom dve tehnike kultivacije, odnosno sumberznom kultivacijom odabranog proizvodnog mikroorganizma i *solid-state* kultivacijom na čvrstim hranljivim podlogama. Procena uspešnosti biosinteze enzima odabranim proizvodnim mikroorganizmom na podlozi sa izabranom sirovinom vrši se na osnovu sadržaja proteina u tečnoj fazi kultivacione podloge ili ekstraktu odnosno filtratu čvrste podloge na kraju procesa i na osnovu njegove aktivnosti prema odgovarajućim supstratima (skrob, karboksimetilceluloza i ksilan), odnosno određivanjem aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza. Ova procena je moguća jer su se procesi odvijali pri istim uslovima kultivacije.

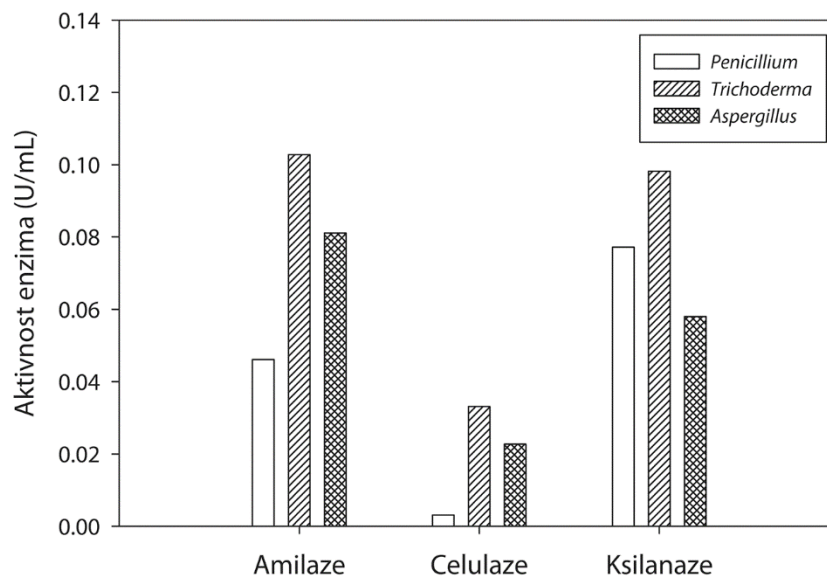
Kultivacijom na lignoceluloznim supstratima proizvodni mikroorganizam *Trichoderma reesei* za potrebe svog rasta i razmnožavanja sintetizuje enzime koje ispušta u podlogu sa ciljem prevođenja složenih u proste (fermentabilne) šećere (Fang i Xia, 2014). *Penicillium* spp. je proizvodni mikroorganizam koji se često primenjuje kao alternativa vrstama iz roda *Trichoderma* spp. i široko je upotrebljavan u proizvodnji velikih količina celulaza i ostalih enzima potrebnih za sinergičku hidrolizu lignocelulozne biomase (Singhania i sar., 2014).

Na slikama 5.1 i 5.2 prikazana je aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza, a na slici 5.3 vrednost sadržaja ukupnih proteina u filtratima nakon kultivacije plesni *Trichoderma reesei*, *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom primenom submerzne i solid-state tehnike kultivacije.



Slika 5.1. Aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza u filtratima nakon kultivacije plesni *Trichoderma reesei*, *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom primenom submerzne tehnike kultivacije

Na osnovu analize rezultata aktivnosti amilaza (koncentracije oslobođenih redukujućih šećera u standardnom rastvoru skroba) u filtratima dobijenim nakon kultivacije *Trichoderma reesei* na pšeničnoj pleVICI može se uočiti da su veće vrednosti dobijene primenom submerzne tehnike kultivacije (0,1779 U/mL). Takođe, rezultati pokazuju da su i vrednosti aktivnosti celulaza (0,0422 U/mL) i ksilanaza (0,148 U/mL) veće submerzne tehnike (Jovanović i sar., 2019). Međutim, ukupan sadržaj proteina u filtratu dobijenom nakon kultivacije *Trichoderma reesei* na pšeničnoj pleVICI pokazuje da se tehnika kultivacije na čvrstim hranljivim podlogama pokazala kao bolja u odnosu na submerznu kultivaciju, pri čemu je dobijena vrednost koja iznosi 0,8526 mg/mL.

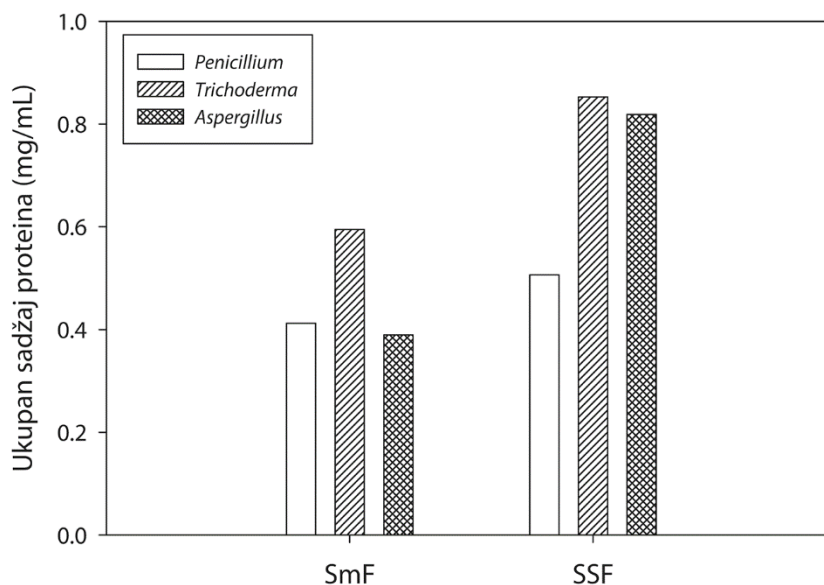


Slika 5.2. Aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza u filtratima nakon kultivacije plesni *Trichoderma reesei*, *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom primenom solid-state tehnike kultivacije

Nakon kultivacije plesni *Penicillium* spp. na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom, na osnovu rezultata prikazanih na slikama 5.1-3, aktivnost ispitivanih enzima pokazuju veće vrednosti kod submerzne kultivacije (0,0589 U/mL za amilaze, 0,0118 U/mL za celulaze i 0,1413 U/mL za ksilanaze) nego primenom solid-state tehnike (0,0461 U/mL za amilaze, 0,0031 U/mL za celulaze i 0,0772 U/mL za ksilanaze), dok sa druge strane vrednost sadržaja ukupnih proteina u filtratima ukazuje da je kultivacija na čvrstim podlogama bolja, pri čemu je dobijena vrednost od 0,5065 mg/mL za razliku od 0,4121 mg/mL kod submerzne kultivacije plesni *Penicillium* spp. (Jovanović i sar., 2019).

Kultivacija plesni *Aspergillus* spp. na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom izvedena je submerznom kultivacijom i kultivacijom na čvrstim hranljivim podlogama i dobijeni rezultati su prikazani na slikama 5.1-3. Sa rezultata prikazanih na pomenutim slikama može se videti da su vrednosti dobijene submerznom kultivacijom za aktivnost amilaza (0,1250 U/mL), celulaza (0,0351/mL) i ksilanaza (0,1259 U/mL) veće u odnosu na vrednosti dobijene *solid-state* kultivacijom, a koje iznose 0,0811 U/mL, 0,0227 U/mL i 0,0580 U/mL, redosledom. Međutim, vrednost ukupnog sadržaja proteina u filtratu nakon kultivacije na čvrstim podlogama primenom plesni *Aspergillus* spp. je veća nego prilikom submerzne kultivacije, odnosno 0,8186 mg/mL u poređenju sa 0,3895 mg/mL (Jovanović i sar., 2019).

Analizom rezultata ovih preliminarnih istraživanja može se zaključiti da je aktivnost ksilanaza veća u odnosu na aktivnost celulaza za određeni proizvodni mikroorganizam i tehniku kultivacije, što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima Hirasawa i sar. (2019).

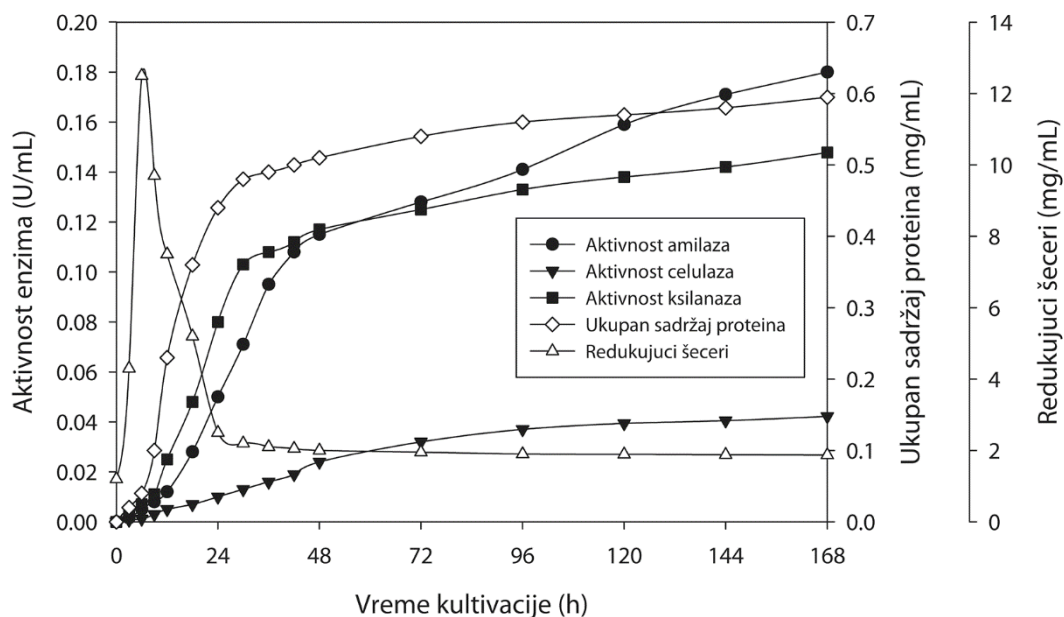


Slika 5.3. Ukupan sadržaj proteina u filtratima nakon kultivacije plesni *Trichoderma reesei*, *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom primenom submerzne (SmF) i solid-state (SSF) tehnike kultivacije

Ako se uporede svi rezultati (slike 5.1-3), kultivacijom plesni *Trichoderma reesei* na pšeničnoj plevici se dobijaju najveće aktivnosti ispitivanih enzima, kao i ukupan sadržaj proteina bez obzira na tehniku kultivacije (Jovanović i sar., 2019). Iz tog razloga je za dalji tok istraživanja, kao proizvodni mikroorganizam, odabran soj *Trichoderma reesei*.

5.3. TOK PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZONOM I SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE PLESNI NA PŠENIČNOJ PLEVICI

Pored odgovarajuće hranljive podloge i proizvodnog mikroorganizma, uspešnost fermentacije zavisi i od poznavanja vrednosti željenih parametara u pojedinim fazama procesa, odnosno poznavanje toka kultivacije (Stanbury i sar., 2019). Poznavanje toka nekog bioprocasa pomaže u njegovom boljem razumevanju, olakšava njegovo prevođenje u veće razmere (scale-up) do konačne industrijalizacije, a samim tim i njegovu kontrolu i upravljanje. Iz tog razloga su izvedeni eksperimenti primenom submerzne i solid-state kultivacije plesni *Trichoderma reesei* na podlozi čije je osnova pšenična plevica, a sa ciljem analize aktivnosti hidrolitičkih enzima (amilaza, celulaza i ksilanaza), ukupnog sadržaja proteina i redukujućih šećera u definisanim vremenskim intervalima bioprocasa. Na slikama 5.4 i 5.5 prikazani su rezultati ispitivanja toka kultivacije za submerznu i solid-state tehniku, redosledom.

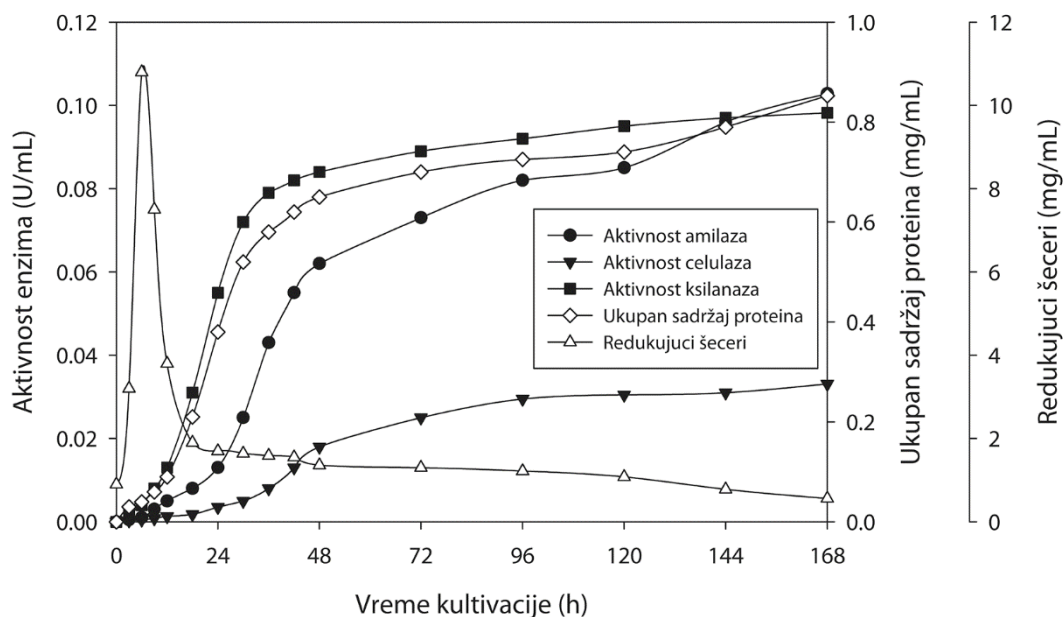


Slika 5.4. Zavisnost aktivnosti enzima (amilaza, celulaza i ksilanaza), ukupnog sadržaja proteina i redukujućih šećera od vremena submerzne kultivacije plesni *Trichoderma reesei* na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 5.4 može se uočiti da aktivnosti ispitivanih hidrolitičkih enzima u kultivacionoj tečnosti imaju intenzivan porast u prvih 48 h, a nakon toga blago povećanje ili stagnaciju do kraja kultivacije. Po istom principu sigmoidalne krive, koja je karakteristična za enzimске sisteme (Pan i sar., 2019), se menja i ukupan sadržaj proteina, s tim da je momenat prelaska sa naglog na slabiji intezitet povećanja ove vrednosti malo ranije u odnosu na aktivnosti ispitivanih enzima i to oko 32 h. Sadržaj redukujućih šećera u prva četiri časa ima intenzivan rast, kada dostiže svoju maksimalnu vrednost od 12,4895 mg/mL, nakon toga naglo opada do 24 h na oko 2 mg/mL i do kraja kultivacije se ova vrednost drastično ne menja.

Analizom aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza u uzorcima uzetim u toku kultivacije plesni na čvrstoj hranljivoj podlozi na bazi pšenične plevice (slika 5.5) evidentno je da vrednosti prvo intezivno rastu do 48 h, nakon toga se do kraja kultivacije blago povećavaju. Kao i kod submerzne kultivacije, ukupan sadržaj proteina prvo ima nagli porast, ali ovaj put do 48 h, a nakon toga neznatno povećanje do 168 h. Maksimalna vrednost sadržaja redukujućih šećera postignuta je već u 4 h klutivacija, nakon čega pada na vrednost ispod 2 mg/mL već u 18 h kultivacije i do kraja nastavlja sa padom do vrednosti od 0,5 mg/mL.

Ispitivanjem toka dve tehnike kultivacije plesni na hranljivoj podlozi na bazi pšenične plevice, ukazano je na to da posotji eventualna mogućnost skraćenja vremena kultivacije, odnosno na potrebu dalje optizacije u vidu procesnih parametara.



Slika 5.5. Zavisnost aktivnosti enzima (amilaza, celuloza i ksilanaza), ukupnog sadržaja proteina i redukujućih šećera od vremena solid-state kultivacije plesni *Trichoderma reesei* na hranljivoj podlozi sa pšeničnom plevicom

5.4. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZONOM TEHNIKOM KULTIVACIJE NA PŠENIČNOJ PLEVICI

Proizvodnja enzima submerznom tehnikom kultivacije ima veliku industrijsku primenu usled mogućnosti bolje kontrole čitavog procesa (Hansen i sar., 2015). Prilikom biosinteze enzima, bilo kojom tehnikom kultivacije, sastav hranljive podloge, način pripreme i doziranje inokuluma, kao i procesni parametri moraju biti optimalni za odabrani proizvodni mikroorganizam. Uzimajući u obzir složenost ćelijskog metabolizma, samo uz primenu optimizovanih uslova proizvodnje moguće je dobiti dovoljnu količinu željenog enzima u takvom obliku da njegovo izdvajanje i prečišćavanje ne bude preskupo (Dodić i Grahovac, 2013). Prilikom optimizacije bioprocasa primena metode odzivne površine ima veliki značaj. Metoda odzivne površine (eng. *Response surface methodology*, RSM) je statistička tehnika koja se učestalo koristi za optimizaciju kvantitativnih podataka dobijenih na osnovu dobro dizajniranih eksperimenata, a sa ciljem određivanja i simultanog rešavanja multivarijantnih problema. Jednačine opisuju efekte ispitivanih parametara na odzive, određuju odnose između parametara i prikazuju kombinovane efekte svih parametara u odzivu. Ona omogućava efikasno ispitivanje procesa ili sistema (Madamba, 2002). U savremenoj naučnoj literaturi moguće je pronaći brojna istraživanja koja su obuhvatala primenu RSM-a za optimizaciju različitih aspekata proizvodnje hidrolitičkih enzima (Hu i sar., 2018).

5.4.1. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZONOM TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Za opis odzivnih funkcija ukupanog sadržaja proteina, aktivnosti amilaza, aktivnosti celulaza i aktivnosti ksilanaza, ispitivan je uticaj temperature bioprocesa (u opsegu 25-35°C), vrednosti pH (u opsegu 4-6) i vremena trajanja bioprocesa (u opsegu 3-7 dana). U tabelama 5.2 i 5.3 su prikazani rezultati fitovanja odabranih odziva sa polinomom drugog reda. Za fitovanje određenog odziva je primenjen stepen polinoma koji je najbolje opisivao dobijene eksperimentalne rezultate, a predložen od strane programa (Jovanović i sar., 2019).

Rezultati analize varijanse modelovanih odziva, koja se primenjuje za ispitivanje značajnosti i adekvatnosti matematičkih modela, su prikazani u tabeli 5.3. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije za sve posmatrane odzive ukazuju na dobro fitovanje eksperimentalno dobijenih podataka sa polinomom drugog. Ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, aktivnost celulaza i aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje enzima submerznom tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici fituje se sa koeficijentima determinacije od 0,9788, 0,9930, 0,9756 i 0,9917, redosledom, što znači da 2,12%, 0,70%, 2,44% i 0,83% varijacija nije moglo biti objašnjeno modelima, redosledom.

Tabela 5.2. Koeficijenti regresione jednačine modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Efekti	Ukupan sadržaj proteina (mg/mL)	Aktivnost		
		Amilaza (U/mL)	Celulaza (U/mL)	Ksilanaza (U/mL)
Odsečak				
x	1,0200	0,2200	0,0400	0,1500
Linearni				
A	0,0470	-0,0042	-0,0041	-0,0067
B	-0,0170	0,0003	-0,0015	-0,0039
C	0,0420	0,1900	0,0130	0,0160
Kvadratni				
A ²	-0,0400	-0,1800	-0,0200	-0,1200
B ²	-0,0044	-0,0120	-0,0077	-0,0055
C ²	-0,0690	-0,0140	-0,0002	0,0021
Interakcije				
AB	-0,1100	-0,0012	-0,0012	-0,0021
AC	0,1500	-0,0079	-0,0061	-0,0120
BC	-0,1500	0,0019	-0,0043	-0,0041

Dobijene F-vrednosti od 85,65, 88,96, 90,32 i 83,61 za ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza, redosledom, potvrđuju da su modeli polinoma drugog reda svih posmatranih odziva značajni pri nivou značajnosti od 95%. Pored toga, značajnost modela potvrđuju i veoma niske *p*-vrednosti. Grafički prikaz poređenja eksperimentalno dobijenih i vrednosti predviđenih modelom su dati na slikama 8.1-8.4 (Poglavlje 8 Prilozi).

Tabela 5.3. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	DF	SS	MS	DF	SS	MS	F	<i>p</i> -vrednost	R ²
Proteini	5	0,018	0,008927	9	0,0610	0,0050	85,65	<0,0001	0,9788
Amilaze	5	0,015	0,007349	9	0,0513	0,0057	88,96	<0,0001	0,9930
Celulaze	5	0,028	0,009384	9	0,0450	0,0037	90,32	<0,0001	0,9756
Ksilanaze	5	0,012	0,004220	9	0,0161	0,0017	83,61	<0,0001	0,9917

Sa ciljem sagledavanja individualnih efekata odabranih parametara i njihovih interakcija prikazana je tabela 5.4. Efekti svih parametara, njihovih interakcija kao i kvadratnih članova su standardizovani. Statistička značajnost koeficijenata, pri nivou značajnosti od 95% pokazuje da je efekat značajan ukoliko je *p*-vrednost manja od 0,05 u datom eksperimentalnom planu.

Tabela 5.4. Statistička značajnost koeficijenata modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Efekti	<i>p</i> -vrednost			
	Ukupan sadržaj proteina (mg/mL)	Aktivnost amilaza (U/mL)	Aktivnost celulaza (U/mL)	Aktivnost ksilanaza (U/mL)
Linearni				
A	0,2013	0,4109	0,0351	0,1140
B	0,6194	0,9473	0,3156	0,3129
C	0,2427	0,0095	0,0030	0,0063
Kvadratni				
A ²	0,4292	<0,0001	0,0002	<0,0001
B ²	0,9281	0,1513	0,0138	0,3396
C ²	0,1989	0,1048	0,9173	0,6926
Interakcije				
AB	0,0598	0,8580	0,5787	0,6946
AC	0,0189	0,2908	0,0288	0,0606
BC	0,0193	0,7783	0,0822	0,4486

Za ukupan sadržaj proteina u filtratima dobijenim nakon kultivacije *Trichoderma reesei* na pšeničnoj plevici putem submerzne tehnike značajni članovi modela su AC i BC, odnosno članovi interakcije temperature i vremena kultivacije i interakcije vrednosti pH i vremena kultivacije, redosledom. Značajni koeficijenti modela za aktivnost amilaza su članovi modela C i A^2 , odnosno linearni član vremena kultivacije i kvadratni član temperature kultivacije. Iz tabele 5.4. se vidi da su članovi modela A, C, AC, A^2 i B^2 značajni za modelovanje odziva aktivnosti celulaza prilikom submerzne kultivacije plesni na pšeničnoj plevici, dok su za aktivnost ksilanaza značajni članovi modela C i A^2 . Na osnovu ove analize može se zaključiti da član A (temperatura kultivacije) i član C (vreme kultivacije) imaju uticaj na sva četiri odabrana odziva, dok član B (vrednost pH) samo na dva (ukupan sadržaj proteina i aktivnost celulaza). Sagledavanje uticaja svih variranih faktora na odabrani odziv je prikazano perturbacionim dijagramima, koji su prikazani na slikama 5.7, 5.9, 5.11 i 5.13.

U tabeli 5.5 prikazani su rezultati analize međusobnih interakcija posmatranih odziva, odnosno njihovi korelacioni koeficijenti, a grafički prikazi istih su dati na slikama 8.5-8.10 (Poglavlje 8 Prilozi). Pozitivne vrednosti svih korelacija odabranih odziva ukazuje na to da sa povećanjem jedne vrednosti raste i druga, dok sama vrednost (između 0 i 1) ukazuje na koliko je ta povezanost jaka (što je bliža 1 do je veza jača). Tako, na primer, vrednosti korelacije ukupnog sadržaja proteina u odnosu na sva tri ostala posmatrana odziva (aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza) je manja od 0,15, što ukazuje na povećanje bilo kog od ova odziva neće znatno uticati na povećanje ukupnog sadržaja proteina. Sa druge strane, međusobne zavisnosti tri odziva vezanih za aktivnost imaju visoke vrednosti korelacije pa se može reći da povećanje bilo koje od tri vrednosti utiče na povećanje druge dve.

Tabela 5.5. Korelacioni koeficijenti modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Odnos	Korelacija	Slika
Aktivnost amilaza vs Aktivnost celulaza	0,755	8.5
Aktivnost amilaza vs Aktivnost ksilanaza	0,983	8.6
Aktivnost amilaza vs Ukupan sadržaj proteina	0,135	8.7
Aktivnost celulaza vs Aktivnost ksilanaza	0,897	8.8
Aktivnost celulaza vs Ukupan sadržaj proteina	0,122	8.9
Aktivnost ksilanaza vs Ukupan sadržaj proteina	0,107	8.10

Kako bi se stekao bolji uvid uticaja variranih parametara, odnosno temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije na posmatrane odzive dobijene regresione jednačine su prikazane trodimenzionalnim odzivnim površinama (slika 5.6, 5.8, 5.10 i 5.12). Analiziranjem prikazanih odzivnih površina može se utvrditi interval vrednosti variranih parametara za koje svaki od odziva ima najveću vrednost. Odzivne površine su crtane tako što su dva parametra varirana, dok je jedan od parametara imao konstantnu vrednost iz centra plana.

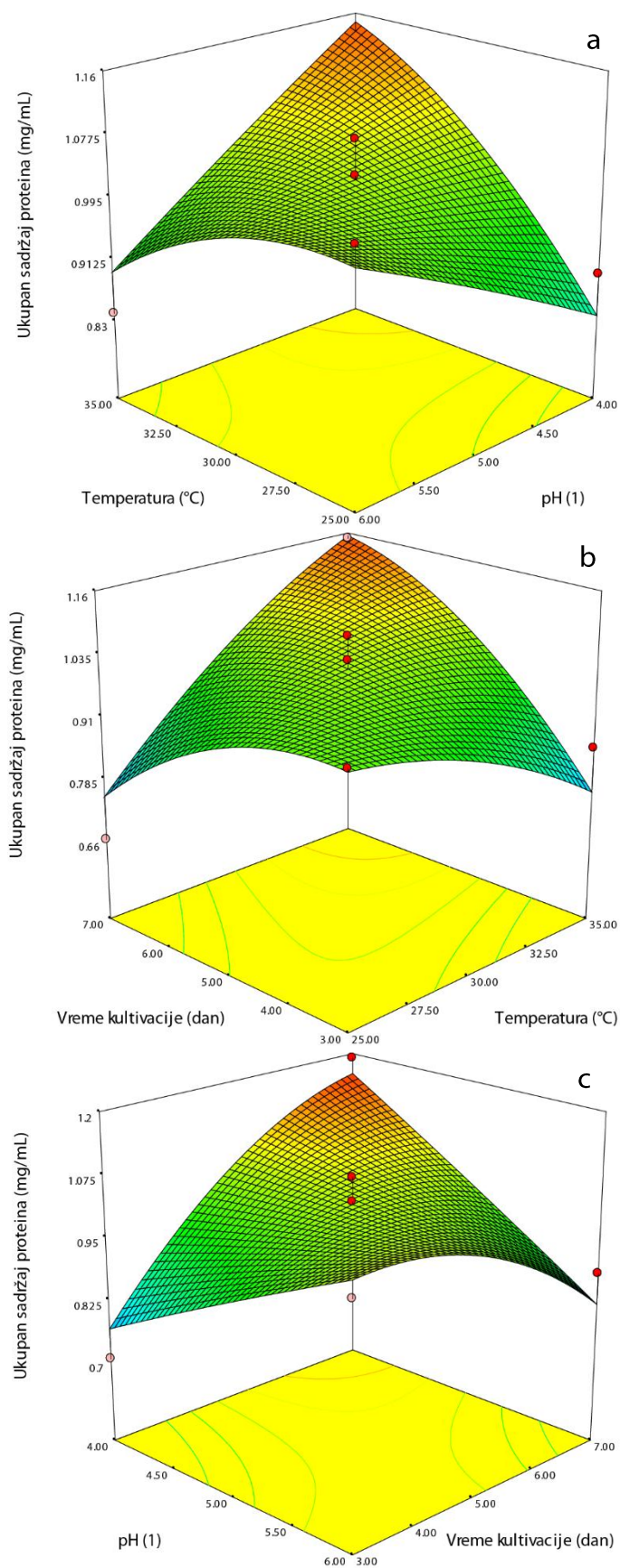
5.4.2. MATEMATIČKI MODEL ZA UKUPAN SADRŽAJ PROTEINA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZONOM TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Odzivne površine prikazane na slici 5.6. prikazuju modelom predviđen uticaj temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje enzima submerznom tehnikom na pšeničnoj plevici, pri čemu svaka od prikazanih odzivnih površina prikazuje modelom predviđen uticaj dva parametra pri konstantnoj vrednosti trećeg.

Na slici 5.6.a je modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti vremena kultivacije od 5 dana. Na osnovu dobijene odzivne površine može se zaključiti da u intervalu vrednosti pH od 5,5 do 6,0 sa povećanjem temperature kultivacije blago opada ukupan sadržaj proteina. Sa druge strane, vrednost ukupnog sadržaja proteina ima intenzivni porast vrednosti sa povećanjem temperature za vrednosti pH u opsegu 4,0-5,5. Isto tako, ukupan sadržaj proteina blago raste sa povećanjem vrednosti pH u opsegu temperatura kultivacije 25,0-27,5 °C, a intenzivno opada sa povećanjem vrednosti pH u intervalu temperatura od 27,5 do 35 °C. Maksimalna vrednost ukupnog sadržaja proteina, od oko 1,14 mg/mL, se ostvaruje pri najvećoj primenjenoj vrednosti temperature kultivacije i najmanjoj vrednosti pH.

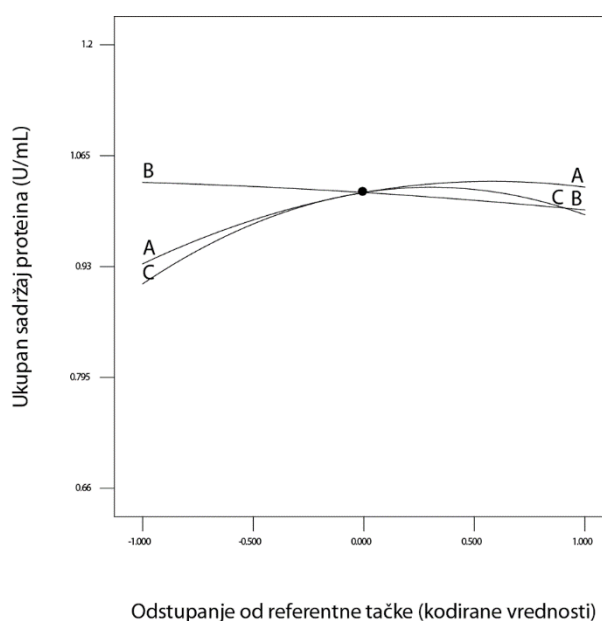
Slika 5.6.b prikazuje modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti pH od 5,0. Sa dobijene odzivne površine može se uočiti da u intervalu temperatura od 25,0 do 27,5 °C ukupan sadržaj proteina blago opada sa porastom vremena kultivacije. Sa druge strane, vrednost ukupnog sadržaja proteina intenzivnije raste sa porastom vremena kultivacije za vrednosti temperatura kultivacije u opsegu 27,5-35,0. Slično tome, u opsegu vremena kultivacije od 3 do 4 dana sa povećanjem temperature kultivacije ukupan sadržaj proteina opada, a u intervalu vremena kultivacije 4-7 dana ukupan sadržaj proteina intenzivnije raste sa povećanjem temperature kultivacije. Maksimalna vrednost ukupnog sadržaja proteina modelom je predviđena pri maksimalnoj ispitanoj temperaturi kultivacije i najdužem vremenu trajanja kultivacije.

Uticaj vrednosti pH i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije od 30 °C je prikazan na slici 5.6.c. Na osnovu dobijene odzivne površine može se uočiti da se najmanje vrednosti datog odziva dobijaju pri kombinacijama najnižih i najviših vrednosti posmatranih parametara (pH 4,0 i 3 dana, kao i pH 6,0 i 7 dana), a srednje vrednosti pri najvećoj vrednosti pH i najmanjoj vrednosti vremena kultivacije (pH 6,0 i 3 dana). Maksimalna vrednost ukupnog sadržaja proteina je dobijena pri najmanjoj primenjenoj vrednosti pH i pri najvećem vremenu trajanja kultivacije.



Slika 5.6. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

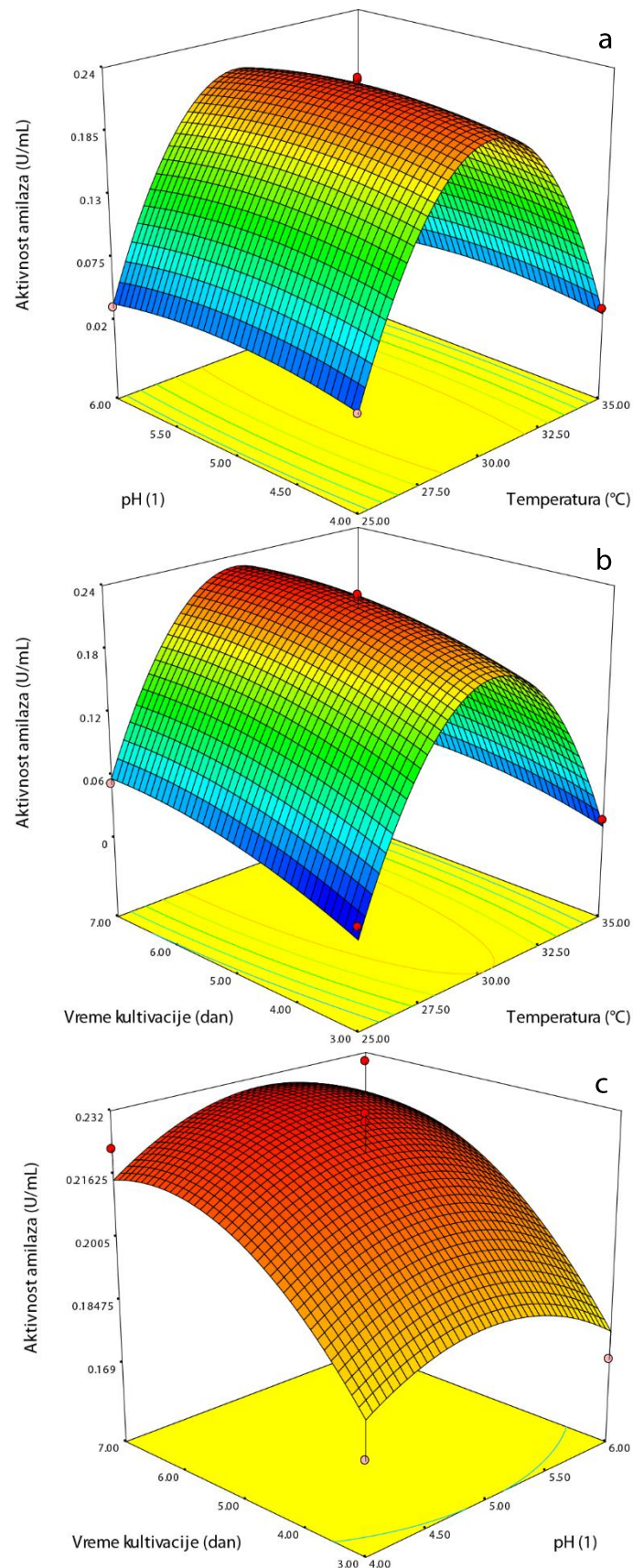
Dijagram perturbacije pokazuje efekat svih parametara na odziv ukupnog sadržaja proteina i prikazan je na slici 5.7. Uzimajući u obzir blagi nagib sve tri krive ukazuje na to da je odziv osetljiv na sve ispitivane parametre. Naime, povećanje parametra B (vrednosti pH) negativno utiče na posmatrani odziv, dok povećanje druga dva parametra (A – temperatura kultivacije i C – vremena kultivacije) ima pozitivan efekat na ukupan sadržaj proteina (sa dostizanjem maksimuma u ispitivanom opsegu datih parametar). Sa ispitivanog grafika se može zaključiti da je posmatrani odziv jednako osetljiv na sve parametre, što se slaže sa analizom rezultata individualnih efekata odabranih parametara u tabeli 5.4.



Slika 5.7. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

5.4.3. MATEMATIČKI MODEL ZA AKTIVNOST AMILAZA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZKOM TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

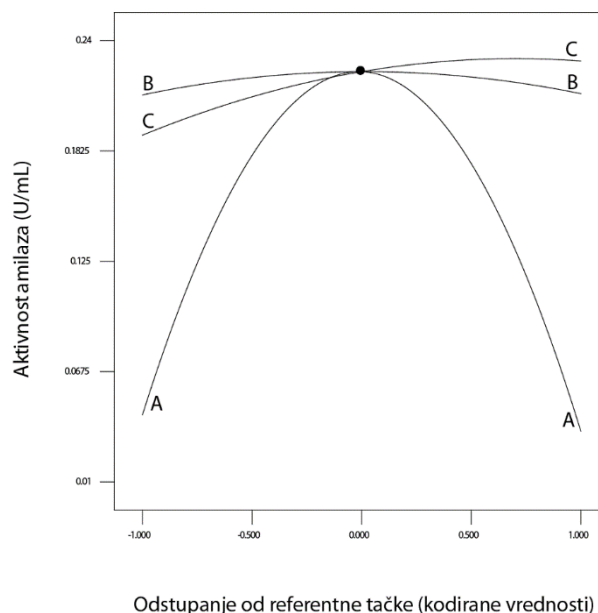
Na slici 5.8.a je modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnom vremenu kultivacije od 5 dana. Na osnovu prikazane odzivne površine može se zaključiti da pri svim vrednostima temperature kultivacije, promena vrednosti pH u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na posmatrani odziv. Sa druge strane, sa sve posmatrane vrednosti pH, aktivnost amilaza prvo raste sa porastom temperature od 25 do 30 °C, nakon toga od 30 do 35 °C opada. Maksimalna vrednost aktivnosti amilaza se postiže pri srednjim vrednostima oba ispitivana procesna parametra.



Slika 5.8. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti pH od 5,0, je prikazan na slici 5.8.b. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da pri svim ispitanim vrednostima temperatura, povećanje vremena kultivacije blago utiče na povećanje aktivnosti amilaza. Temperatura kultivacije, sa druge strane, dovodi do povećanja posmatranog odziva sa povećanjem temperature od 25 do 30 °C, a od 30 do 35 °C dovodi do smanjenja aktivnosti amilaza, pri svim vrednostima vremena kultivacije. Maksimalna vrednost aktivnosti amilaza prema predviđanjima modela se postiže srednjim vrednostima temperatura i višim vrednostima vremena kultivacije (5-7 dana).

Uticaj vrednosti pH i vremena kultivacije predviđen modelom, na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije od 30 °C, prikazan je na slici 5.8.c. Odzivna površina pokazuje da postoji maksimalna vrednost aktivnosti amilaza pri srednjim vrednostima pH za čitav opseg ispitivanog prametra vremena kultivacije, i da postoji maksimum posmatranog odziva pri najvećim vrednostima vremena trajanja kultivacije pri svim vrednostima pH. Na osnovu prikazane odzivne površine može se zaključiti da je najveća aktivnost amilaza predviđena modelom, dobijena pri srednjim vrednostima pH (4,5-5,5) i najvećim vremenom trajanja kultivacije (6-7 dana).



Slika 5.9. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

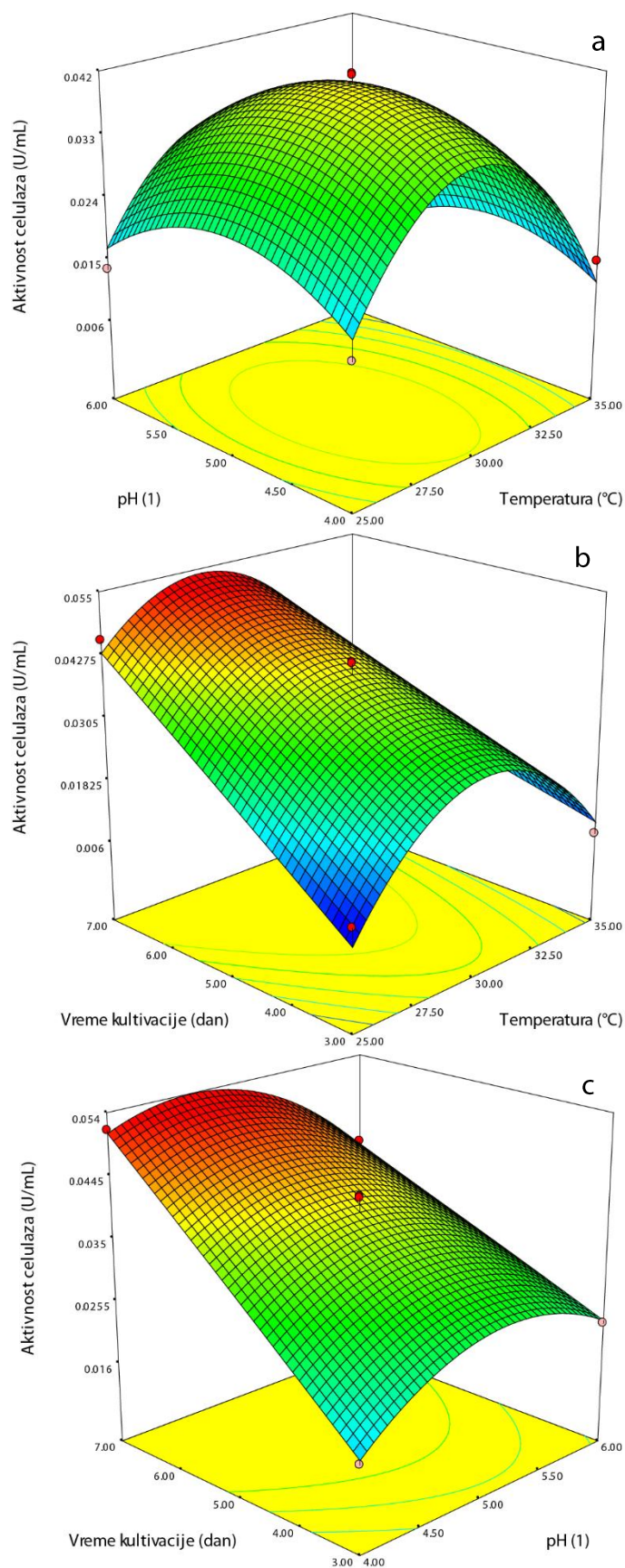
Na slici 5.9 prikazan je dijagram perturbacije ispitivanih parametara, odnosno temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije, na aktivnost amilaza nakon proizvodnje enzima submerznom tehnikom kultivacije na hranljivoj podlozi koja sadrži pšeničnu plevicu, na osnovu kog se može zaključiti da na posmatrani odziv najveći uticaj ima parametar A (temperatura kultivacije) u obliku parabole sa maksimumom u centralnoj tački (kvadratni član modela, tabel 5.4). Po uticajnosti, sledeći je parametar C (vreme kultivacije), a uticaj parametra B (vrednosti pH) je neznatan.

5.4.4. MATEMATIČKI MODEL ZA AKTIVNOST CELULAZA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZNOM TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

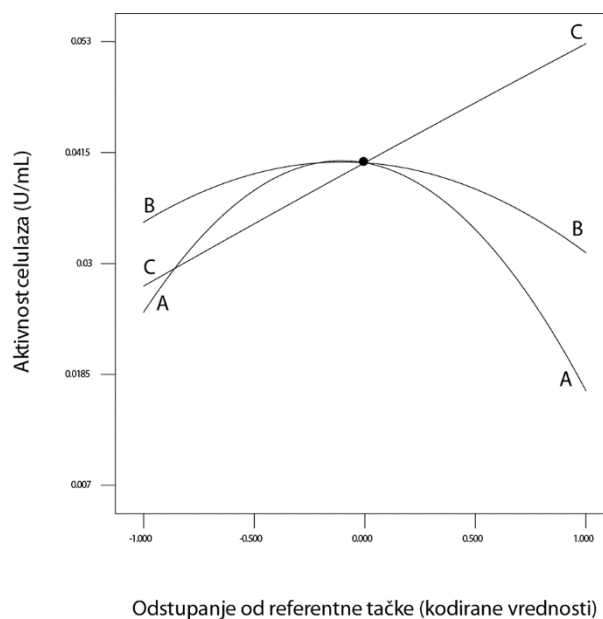
Na slici 5.10.a se vidi uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH pri konstantnom vremenu bioprocesa od 5 dana, na aktivnost celulaza kako ga predviđa model. Sa dobijene odzivne površine se može videti da aktivnost celulaza ima najveće vrednosti pri srednjim vrednostima jednog parametra za čitav opseg drugog parametra i obrnuto. Tako se maksimalna vrednost ispitivanog odziva postiže pri srednjim vrednostima temperature kultivacije (28-32 °C) i srednjim vrednostima pH (4,5-5,5).

Uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri vrednosti pH 5,0, je dat na slici 5.10.b. Sa dobijene odzivne površine može se videti da pri svim vremenima kultivacije (3-7 dana), s povećanjem temperature od 25 do 30 °C dolazi prvo do porasta aktivnosti datog enzima, a nakon toga od 30 do 35 °C do pada pomenute vrednosti. Za čitav opseg temperatura kultivacije, aktivnost celulaza rase sa porastom vremena kultivacije. Maksimalna aktivnost celulaza predviđena modelom postiže se u opsegu početne temperature kultivacije od 28 do 32 °C i pri najvećoj vrednosti vremena kultivacije.

Slika 5.10.c prikazuje modelom predviđen vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije od 30 °C. Dobijeni rezultati pokazuju da pri konstantnoj vrednosti pH, sa povećanjem vremena trajanja bioprocesa dolazi do porasta vrednosti aktivnosti celulaza. Sa druge strane, pri konstantnim vrednostima vremena kultivacije, vrednost datog odziva prvo raste sa porastom vrednosti pH, a nakon toga opada, za čitav ispitivan opseg vremena kultivacije. Maksimalna vrednost aktivnosti celulaza modelom je predviđena u opsegu srednjih vrednosti pH i najvećih vrednosti vremena trajanja kultivacije.



Slika 5.10. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

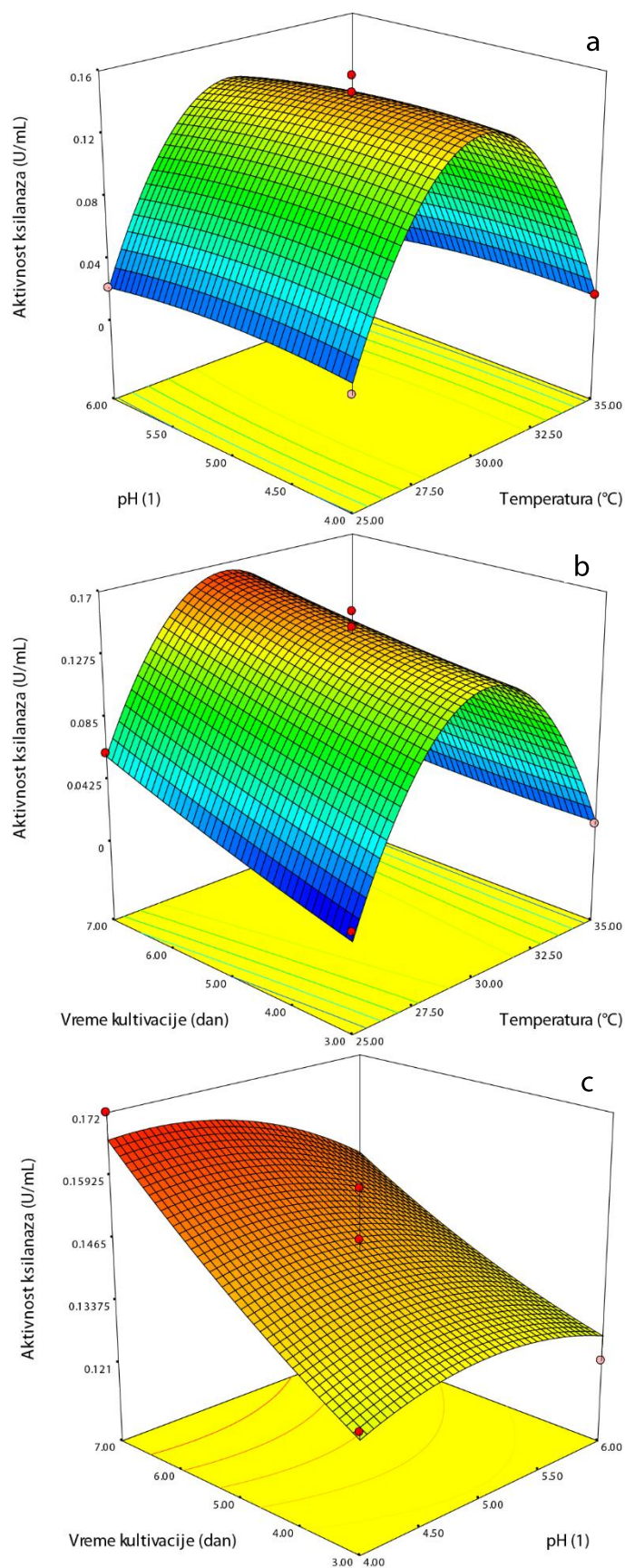


Slika 5.11. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Dijagram perturbacije početne temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje enzima submerznom tehnikom kultivacije na hranljivoj podlozi koja sadrži pšeničnu plevicu, je prikazan na slici 5.11. Dobijene krive ukazuju da je posmatrani odziv osetljiv najviše na temperaturu bioprocasa (kao što je već zaključeno kod tabele 5.4), zatim na vreme kultivacije, pa na kraju na vrednost pH. Krive u obliku parabole za parametra A i B ukazuju na postojanje maksimalne vrednosti u ispitivanom opsegu, dok prava linija za parametar C ukazuje na lineranu zavisnost između aktivnosti celulaza i vremena kultivacije.

5.4.5. MATEMATIČKI MODEL ZA AKTIVNOST KSILANAZA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZONOM TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

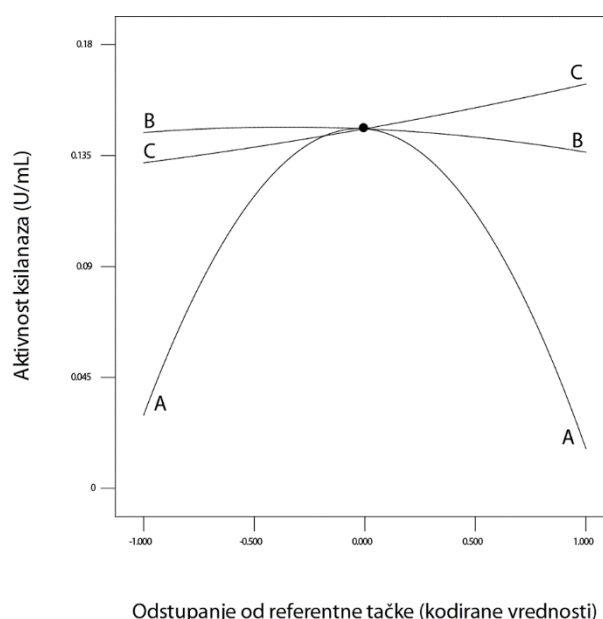
Slika 5.12.a prikazuje modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice pri konstantnom vremenu kultivacije od 5 dana. Dobijeni rezultati pokazuju da pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije, povećanje vrednosti pH utiče na blago smanjenje vrednosti posmatranog odziva. Pri konstantnim vrednostima pH, povećanje temperature prvo dovodi do porasta aktivnosti ksilanaza, a potom do smanjenja. Drugim rečima, maksimalna vrednost aktivnosti ksilanaza se postiže pri srednjim vrednostima temperature kultivacije i nižim vrednostima pH.



Slika 5.12. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije, pri vrednosti pH od 5,0, na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice se može vidjeti na slici 5.12.b. Dobijeni rezultati pokazuju da pri konstantnim vrednostima temperature, povećanje vremena bioprocesa pozitivno utiče na aktivnost željenog enzima. Sa druge strane, povećanje temperature kultivacije prvo dovodi do povećanja vrednosti datog odziva, a nakon toga do njegovo smanjenja, pri konstantnim vrednostima vremena kultivacije. Prema predviđanjima modela, maksimalna aktivnost ksilanaza se dobija pri srednjim vrednostima temperature i najvećim vrednostima vremena kultivacije.

Zavisnost aktivnosti ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice od vrednosti pH i vremena kultivacije, pri konstantnoj temperaturi od 30 °C je prikazan na slici 5.12.c. Dobijena odzivna površina ukazuje da u celom primenjenom opsegu vrednosti pH, sa povećanjem vremena bioprocesa dolazi do povećanja aktivnosti ksilanaza. Do blažeg povećanja dolazi i pri smanjenju vrednosti pH uz održavanje vremena kultivacije konstantnim. Maksimalna modelom predviđena vrednost aktivnosti ksilanaza se dobija primenom najmanje vrednosti pH i najveće vrednosti vremena kultivacije.



Slika 5.13. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Dijagram perturbacije, prikazan na slici 5.13, pokazuje efekat svih parametara na odziv aktivnosti ksilanaza. Temperatura kultivacije (A) ima paraboloidan uticaj na odziv (odnosno postoji maksimum), vrednost pH (B) ima negativan uticaj (povećanje parametra dovodi do smanjenja odziva), a vreme kultivacije (C) pozitivan uticaj (obrnuto u odnosu na parametar B).

5.4.6. OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SUBMERZONOM TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Za definisanje optimalne temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije primenjena je metoda željene funkcije, koja se najčešće koristi za optimizaciju procesa sa dva ili više odziva (Vučurović, 2015). Generalni pristup sastoji se u konvertovanju individualnih odziva u individualne željene funkcije čije vrednosti se kreću od 0 do 1. Vrednost individualne željene funkcije „0“ predstavlja najlošiju vrednost, vrednost „1“ predstavlja najbolju vrednost posmatranog odziva, dok je ukupna željena funkcija jednaka geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija (Hu i sar., 2018).

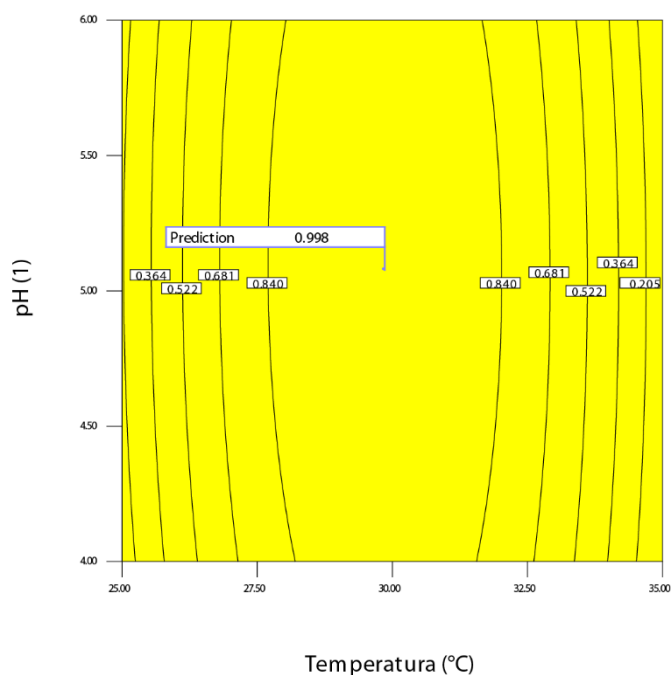
Za optimizaciju kultivacije plesni submerznom tehnikom kultivacije na podlozi čija je osnova pšenična plevica, odabrani odzivi su ukupan sadržaj proteina i aktivnosti dobijenih hidrolitičkih enzima. S obzirom da plesan *Trichoderma reesei* tokom kultivacije sintetiše enzime koji razlažu složeni supstrat do prostih šećera, neophodno je postići maksimalno moguću količinu enzima sa što većom aktivnošću uz minimalan utrošak supstrata i energije.

Prema navedenom, cilj optimizacije je odabir temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije za koje će odabrani odziv ukupnog sadržaja proteina i aktivnosti hidrolitičkih enzima (amilaza, celuloza i ksilanaza) biti maksimalan (Jovanović i sar., 2019).

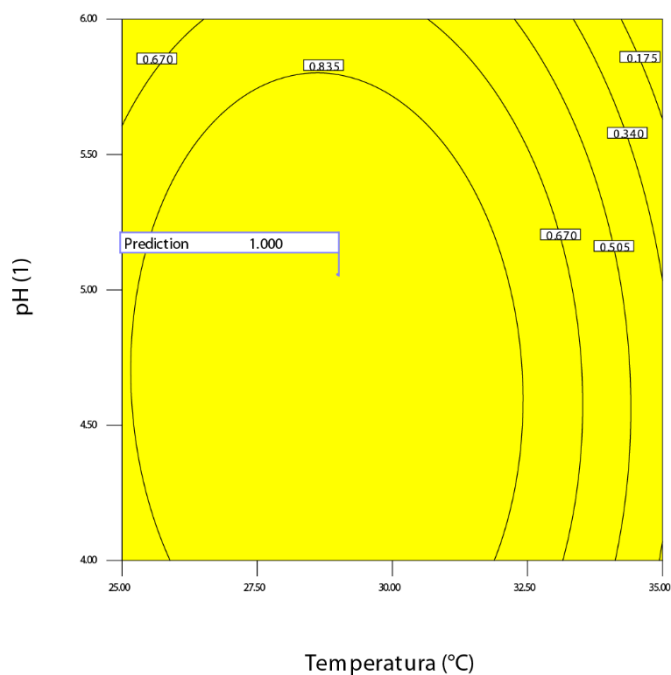
Na slici 5.14 su prikazani rezultati optimizacije eksperimentalnih vrijednosti. Cilj je bio da se utvrdi zavisnost vrednosti željene funkcije za aktivnost amilaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice. Maksimalna vrednost željene funkcije koja iznosi 0,998 se postiže pri temperaturi kultivacije u intervalu od 29-31 °C, pri vrednosti pH 4,8-5,1 i vremenu kultivacije 6,3-6,5 dana.

Zavisnost vrednosti željene funkcije za aktivnost celulaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice je data na slici 5.15. U cilju postizanja maksimalne aktivnosti celulaza, vrednost temperatur kultivacije treba da bude veća u opsegu 28-29 °C, vrednost pH 4,9-5,1, a vreme kultivacije između 6,6 i 6,8 dana. Pod ovim uslovima vrednost željenje funkcije iznosi 1,000.

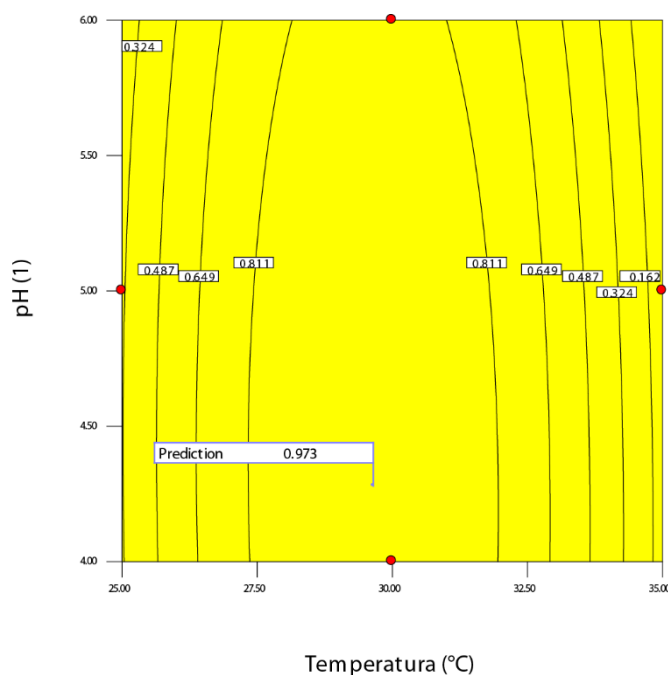
Vrednost ukupne željene funkcije za maksimalnu aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice je prikazana na slici 5.16. U definisanim opsezima ispitivanih parametara, variranjem temperature kultivacije u intervalu 29-30,5 °C, vrednosti pH 4,0-4,5 i vremena kultivacije na 7 dana, vrednost ukupne željene funkcije je maksimalan i iznosi 0,973.



Slika 5.14. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za aktivnost amilaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



Slika 5.15. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za aktivnost celulaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



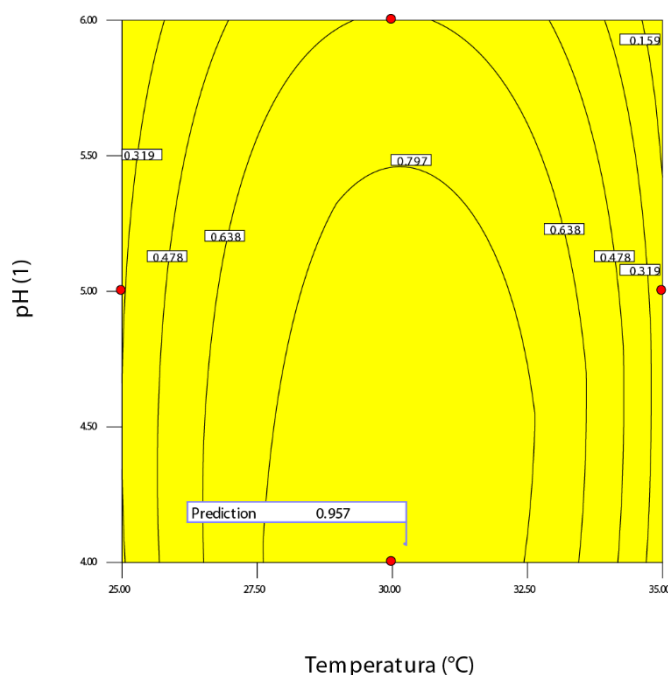
Slika 5.16. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za aktivnost ksilanaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Tabela 5.6. Rezultati optimizacije proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice (A – aktivnost amilaza, C – aktivnost celulaza, K – aktivnost ksilanaza i P – ukupan sadržaj proteina)

Kriterijum optimizacije				Optimalne vrednosti			Predviđanje modela			
A	C	K	P	T (°C)	pH (1)	t (dan)	A (U/mL)	C (U/mL)	K (U/mL)	P (mg/mL)
*				29,87	5,07	6,43	0,2307	0,0491	0,1581	1,0013
	*			28,38	5,02	6,78	0,2144	0,0523	0,1544	0,9363
		*		29,65	4,27	7,00	0,2213	0,0535	0,1676	1,0935
			*	31,82	4,23	6,48	0,1947	0,0433	0,1396	1,1939
*			*	30,54	4,00	7,00	0,2119	0,0497	0,1633	1,1906
	*		*	30,69	4,05	7,00	0,2115	0,0498	0,1621	1,1906
		*	*	30,54	4,00	7,00	0,2119	0,0497	0,1633	1,1906
*	*			29,81	5,01	6,73	0,2303	0,0514	0,1619	0,9965
*		*		29,74	4,78	7,00	0,2284	0,0541	0,1661	1,0180
	*	*		29,64	4,28	7,00	0,2214	0,0535	0,1676	1,0927
*	*		*	30,54	4,04	7,00	0,2130	0,0501	0,1634	1,1833
*		*	*	30,54	4,00	7,00	0,2119	0,0497	0,1633	1,1906
	*	*	*	30,50	4,00	7,00	0,2123	0,0498	0,1636	1,1886
*	*	*	*	30,26	4,06	7,00	0,2157	0,0510	0,1655	1,1634

U tabeli 5.6 su prikazani svi rezultati optimizacije porizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice.

Konačno, rezultat optimizacije (ispitivanih parametara u zadatim opsezima), sa ciljem postizanja maksimalno mogućeg ukupnog sadržaja proteina uz maksimalnu aktivnost svih prisutnih hidrolitičkih enzima, prikazan je i poslednjem redu tabele 5.6, a grafik željene funkcije na slici 5.17. Maksimalna vrednost željene funkcije od 0,957 postiže se pri vrednostima temperature od 30,26, vrednosti pH 4,06 i vremena kultivacije 7 dana.



Slika 5.17. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

5.5. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE NA PŠENIČNOJ PLEVICI

Tehnika na čvrstim i polučvrstim hranljivim podlogama podrazumeva izvođenje bioprocasa u odsustvu slobodne vode. Voda se nalazi apsorbovana ili vezana u kompleksnom obliku unutar čvrstog nosača. U zavisnosti od prirode supstrata, količina apsorbovane vode može biti i nekoliko puta veća od sadržaja suve materije pri čemu je obezbeđena relativno visoka aktivnost vode (a_w vrednost) na granicama faza čvrsto/gas. Difuzija nutrijenata i metabolita je ograničena pri niskim vrednostima aktivnosti vode, dok pri visokim vrednostima aktivnosti vode dolazi do komprimovanja supstrata. Stoga je od suštinskog značaja za uspešnost bioprocasa na čvrstim i poučvrstim podlogama odgovarajuća vrednost aktivnosti vode.

Kao proizvodni mikroorganizmi najčešće se upotrebljavaju filamentozne plesni koje osim rasta na površini čestica supstrata imaju sposobnost rasta i unutar njih. Supstrat za izvođenje bioprocesa na čvrstim i polučvrstim hranljivim podlogama treba da ima veliku graničnu površinu čvrsto/gas po jedinici zapremine (uobičajeno u opsegu $10^3 - 10^6 \text{ m}^2/\text{cm}^3$) da bi se obezbedila odgovarajuća metabolička aktivnost mikroorganizma. Sitne čestice supstrata obezbeđuju veliku površinu dostupnu mikroorganizmima, ali su tada aeracija i termoregulacija otežane usled male zapremine prostora između čestica. Nasuprot tome, krupnije čestice supstrata obezbeđuju bolju aeraciju i razmenu toplote, ali imaju manju kontaktnu površinu. Za izvođenje bioprocesa na čvrstim i polučvrstim hranljivim podlogama uobičajeno se promenjuje smeša dve različite veličine čestica supstrata. Odnos količine finih i grubih čestica se optimizuje sa ciljem povećanja uspešnosti bioprocesa.

Prednosti primene tehnike na čvrstim i polučvrstim podlogama su mogućnost primena supstrata nerastvornih u vodi, olakšano izdvajanje proizvoda koji je u supstratu u velikoj koncentraciji, mala količina otpadne vode, lako sušenje proizvoda usled male vlažnosti, velika stabilnost dobijenih enzima i mala mogućnost bakterijske kontaminacije. Nedostaci ove tehnike su ograničenje u pogledu vrste mikroorganizma, mogućnost kontaminacije neželjenim plesnima, složena konstrukcija bioreaktora i otežana kontrola i regulacija bioprocesa (Dodić i Grahovac, 2013).

5.5.1. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Za opis odzivnih funkcija ukupanog sadržaja proteina, aktivnosti amilaza, aktivnosti celulaza i aktivnosti ksilanaza, ispitivan je uticaj temperature kultivacije (25-35 °C), vrednosti pH (u opsegu 4-6) i vremena trajanja bioprocesa (u opsegu 3-7 dana). U tabelama 5.7 i 5.8 su prikazani rezultati fitovanja odabranih odziva sa polinomom drugog reda. Za fitovanje određenog odziva je primenjen stepen polinoma koji je najbolje opisivao dobijene eksperimentalne rezultate, a predložen od strane programa.

Rezultati analize varijanse modelovanih odziva, koja se primenjuje za ispitivanje značajnosti i adekvatnosti matematičkih modela, su prikazani u tabeli 5.8. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije za sve posmatrane odzive ukazuju na dobro fitovanje eksperimentalno dobijenih podataka sa polinomom drugog reda. Ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, aktivnost celulaza i aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje enzima solid-state tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici fituje se sa koeficijentima determinacije od 0,9345, 0,9861, 0,9438 i 0,9687, redosledom, što znači da 6,55%, 1,39%, 5,62% i 3,13% varijacija nije moglo biti objašnjeno modelima, redosledom (Jovanović i sar., 2019).

Tabela 5.7. Koeficijenti regresione jednačine modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Efekti	Ukupan sadržaj proteina (mg/mL)	Aktivnost		
		Amilaza (U/mL)	Celulaza (U/mL)	Ksilanaza (U/mL)
Odsečak				
x	0,4400	0,0490	0,0110	0,1200
Linearni				
A	0,0430	0,0150	0,0057	-0,0025
B	0,0810	0,0320	0,0023	-0,0028
C	0,0420	0,0100	-0,0011	0,0290
Kvadratni				
A ²	-0,0400	0,0160	-0,0022	-0,0290
B ²	0,0380	0,0260	-0,00005	-0,0039
C ²	0,0470	-0,0200	0,0140	-0,0067
Interakcije				
AB	0,0310	0,0370	0,0014	-0,0069
AC	-0,0610	0,0044	-0,0100	-0,0091
BC	0,0180	0,0120	0,0025	0,0070

Dobijene F-vrednosti od 86,11, 85,57, 83,91 i 80,35 za ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, aktivnost celulaza i aktivnost ksilanaza, redosledom, potvrđuju da su modeli polinoma drugog svih posmatranih odziva značajni pri nivou značajnosti od 95%. Pored toga, značajnost modela potvrđuju i veoma niske p-vrednosti. Grafički prikaz poređenja eksperimentalno dobijenih i vrednosti predviđenih modelom su dati na slikama 8.11-8.14 (Poglavlje 8 Prilozi).

Tabela 5.8. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	DF	SS	MS	DF	SS	MS	F	p-vrednost	R ²
Proteini	5	0.66	0.13	9	19.23	2.14	86.11	<0.0001	0.9345
Amilaze	5	2.84	0.57	9	28.51	3.17	85.57	<0.0001	0.9861
Celulaze	5	0.58	0.12	9	4.10	0.46	83.91	<0.0001	0.9438
Ksilanaze	5	0.66	0.13	9	4.15	0.46	80.35	<0.0001	0.9687

Sa ciljem sagledavanja individualnih efekata odabranih parametara i njihovih interakcija prikazana je tabela 5.9. Efekti svih parametara, njihovih interakcija kao i kvadratnih članova su standardizovani. Statistička značajnost koeficijenata, pri nivou značajnosti od 95% pokazuje da je efekat značajan ukoliko je p-vrednost manja od 0,05 u datom eksperimentalnom planu.

Tabela 5.9. Statistička značajnost koeficijenata modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Efekti	p-vrednost			
	Ukupan sadržaj proteina (mg/mL)	Aktivnost amilaza (U/mL)	Aktivnost celulaza (U/mL)	Aktivnost ksilanaza (U/mL)
Linearni				
A	0,2531	0,2767	0,1715	0,7133
B	0,0483	0,0485	0,5464	0,6799
C	0,2637	0,4522	0,7693	0,0060
Kvadratni				
A ²	0,4454	0,4110	0,6940	0,0274
B ²	0,4737	0,2048	0,9928	0,6936
C ²	0,3796	0,3202	0,0475	0,5067
Interakcije				
AB	0,0392	0,0859	0,7946	0,4804
AC	0,2511	0,8098	0,1053	0,3620
BC	0,7156	0,5146	0,6425	0,4742

Za ukupan sadržaj proteina u filtratima dobijenim nakon kultivacije *Trichoderma reesei* na pšeničnoj plevici putem solid-state tehnike jedini značajan član modela je B, odnosno član vrednosti pH. Značajni koeficijent modela za aktivnost amilaza je takođe član modela B, odnosno linearni član vrednosti pH. Iz tabele 5.4. se vidi da je član modela C² (kvadratni član vremena kultivacije) značajni za modelovanje odziva aktivnosti celulaza prilikom solid-state kultivacije plesni na pšeničnoj plevici, dok su za aktivnost ksilanaza značajni članovi modela C i A² (linearni član vremena kultivacije i kvadratni član temperature kultivacije). Na osnovu ove analize može se zaključiti da je podeljen uticaj članova na odabrane odzive, odnosno član B (vrednost pH) utiče na ukupan sadržaj proteina i aktivnost amilaza, dok član C (vreme kultivacije) ima uticaj na aktivnost celulaza i ksilanaza, a član A (temperatura kultivacije) samo na aktivnost ksilanaza. Sagledavanje uticaja svih variranih faktora na odabrani odziv je prikazano perturbacionim dijagramima, koji su prikazani na slikama 5.19, 5.21, 5.23 i 5.25.

U tabeli 5.10 prikazani su rezultati analize međusobnih interakcija posmatranih odziva, odnosno njihovi korelacioni koeficijenti, a grafički prikazi istih su dati na slikama 8.15-8.20 (Poglavlje 8 Prilozi). Pozitivne vrednosti korelacija ukazuje na to da sa povećanjem jedne vrednosti raste i druga, a za negativne je obrnuto, sa povećanjem jedne druga opada, dok sama vrednost (između 0 i 1) ukazuje na koliko je ta povezanost jaka (što je bliža 1 do je veza jača). Jedina jaka veza između odziva se uočava kod aktivnosti celulaza i ukupnog sadržaja proteina, dok duplo manju povezanog imaju aktivnost amilaza i ukupan sadržaj proteina, a najmanju aktivnost celulaza i ukupan sadržaj proteina. Sa druge strane, međusobne povezanosti odziva aktivnosti hidrolitičkih enzima su negativne, što znači da ako raste aktivnost jednog enzima, aktivnost drugog enzima opada.

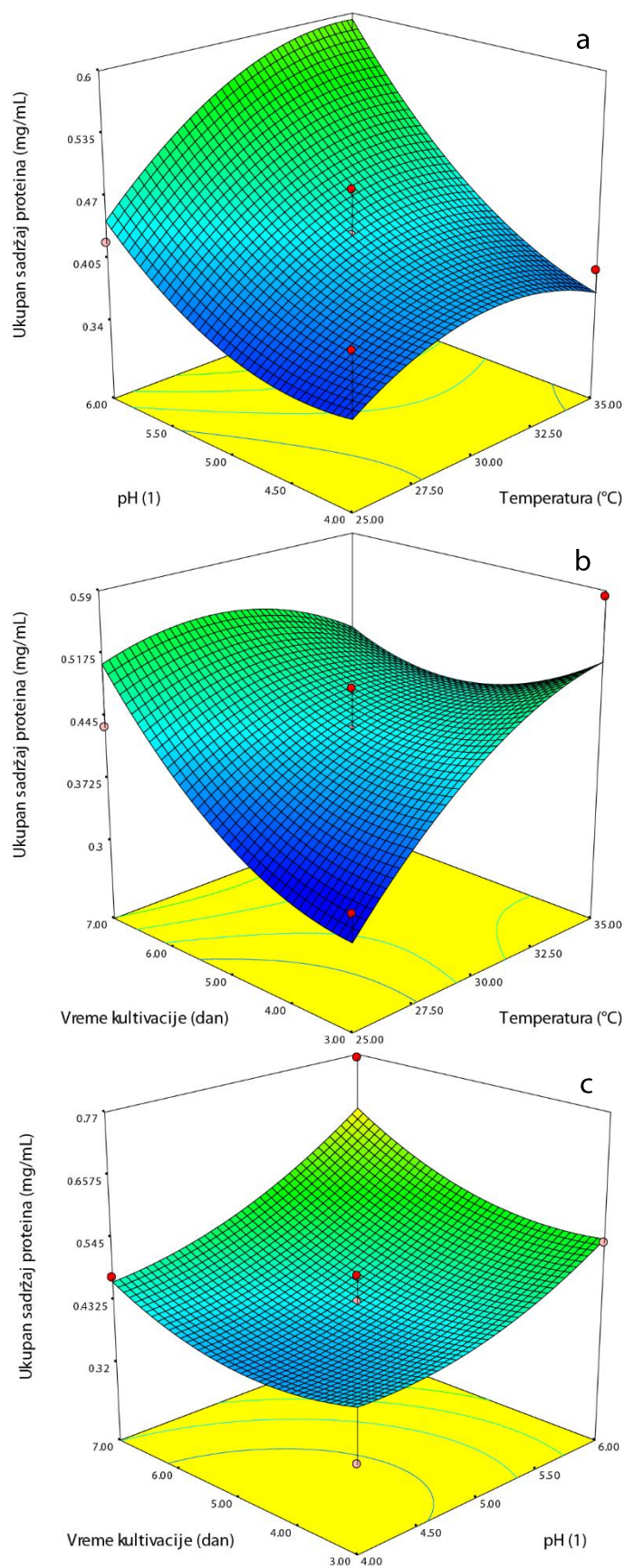
Tabela 5.10. Korelacioni koeficijenti modelovanih odziva za proizvodnju hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije na pšeničnoj plevici

Odnos	Korelacija	Slika
Aktivnost amilaza vs Aktivnost celulaza	-0,048	8.15
Aktivnost amilaza vs Aktivnost ksilanaza	-0,139	8.16
Aktivnost amilaza vs Ukupan sadržaj proteina	0,357	8.17
Aktivnost celulaza vs Aktivnost ksilanaza	-0,184	8.18
Aktivnost celulaza vs Ukupan sadržaj proteina	0,708	8.19
Aktivnost ksilanaza vs Ukupan sadržaj proteina	0,130	8.20

Kako bi se stekao bolji uvid uticaja variranih parametara, odnosno temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije na posmatrane odzive, odnosno ukupan sadržaj proteina, kao i aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza dobijene regresione jednačine su prikazane trodimenzionalnim odzivnim površinama (slika 5.18, 5.20, 5.22 i 5.24). Analiziranjem prikazanih odzivnih površina može se utvrditi interval vrednosti variranih parametara za koje svaki od odziva ima najveću vrednost. Odzivne površine su crtane tako što su dva parametra varirana, dok je jedan od parametara imao konstantnu vrednost iz centra plana.

5.5.2. MATEMATIČKI MODEL ZA UKUPAN SADRŽAJ PROTEINA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Odzivne površine prikazane na slici 5.18. prikazuju modelom predviđen uticaj temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje enzima solid-state tehnikom na pšeničnoj plevici, pri čemu svaka od prikazanih odzivnih površina prikazuje modelom predviđen uticaj dva parametra pri konstantnoj vrednosti trećeg.



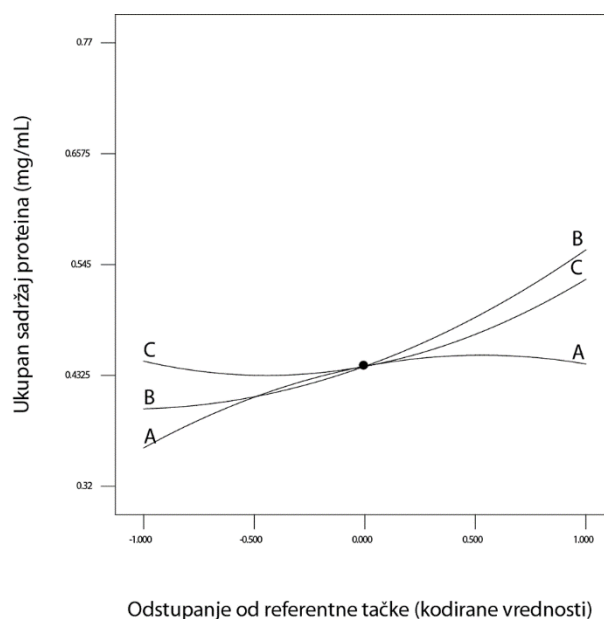
Slika 5.18. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Na slici 5.18.a je modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti vremena kultivacije od 5 dana. Sa dobijene odzivne površine može se uočiti da pri nižim vrednostima pH (4-5) ukupan sadržaj proteina se ne menja drastično u ispitivanom opsegu temperatura kultivacije, dok pri višim vrednostima pH (5-6) dolazi do porasta posmatranog odziva sa porastom temperature. Sa druge strane, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije, sa porastom vrednosti pH raste i ukupan sadržaj proteina. Maksimalna vrednost ukupnog sadržaja proteina se ostvaruje pri najvećoj vrednosti temperature kultivacije i najvećoj vrednosti pH.

Slika 5.18.b prikazuje modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti pH od 5,0. Na osnovu dobijene odzivne površine može se zaključiti da pri nižim vrednostima vremena kultivacije (3-5 dana) porast temperature kultivacije povećava ukupan sadržaj proteina, a pri višim vrednostima vremena kultivacije (5-7 dana) vrednost posmatranog odziva blago opada sa porastom temperature kultivacije. Sa druge strane, pri manjim vrednostima temperatura kultivacije (25-30 °C) povećanje vremena kultivacije pozitivno utiče na ukupan sadržaj proteina, dok pri većim vrednostima temperature (30-35 °C) povećanje vremena kultivacije blago smanjuje ukupan sadržaj proteina.

Uticaj vrednosti pH i vremena kultivacije na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije od 30 °C je prikazan na slici 5.18.c. Na osnovu dobijene odzivne površine može se uočiti da u celom primenjenom opsegu vrednosti pH sa porastom vremena kultivacije blago raste i ukupan sadržaj proteina. Kada je u pitanju konstantna vrednost vremena kultivacije porast posmatranog odziva je mnogo veći prilikom povećanja vrednosti pH. Maksimalna vrednost ukupnog sadržaja proteina je dobijena pri najvećoj primenjenoj vrednosti pH (6,0) i nadužem vremenu kultivacije (7 dana).

Dijagram perturbacije pokazuje efekat svih parametara na odziv ukupnog sadržaja proteina i prikazan je na slici 5.19. Sa ispitivanog grafika se može zaključiti da je posmatrani odziv osetljiv na sve parametre, ali da najveći uticaj ima član A (vrednost pH), što se slaže sa analizom rezultata individualnih efekata odabranih parametara iz tabele 5.9. Uočavaju se takođe i blagi uticaji druga dva člana A (temperature kultivacije) i C (vremena kultivacije) ali ne u tolikoj meri kao za član B u datom ispitivanom opsegu analiziranih procesnih parametar. Najveća je razlika u najmanjoj i najvećoj vrednosti posmatranog odziva kod uticaja koji je vezan za član B.

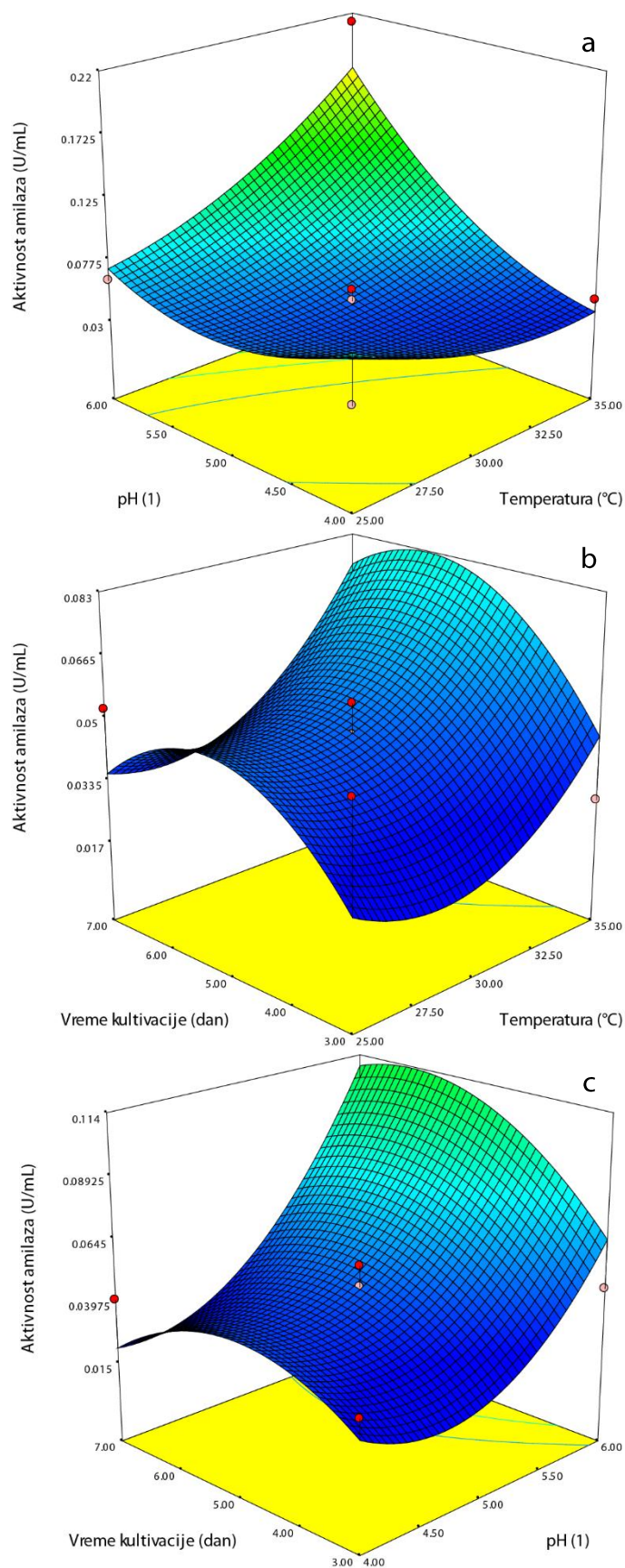


Slika 5.19. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na ukupan sadržaj proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

5.5.3. MATEMATIČKI MODEL ZA AKTIVNOST AMILAZA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

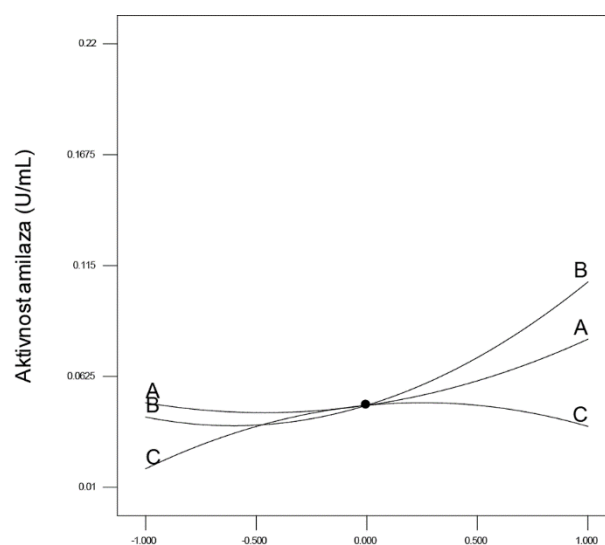
Na slici 5.20.a je modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti vremena kultivacije od 5 dana. Na osnovu prikazane odzivne površine može se zaključiti da pri nižim vrednostima jednog i drugom parametra ne dolazi do značajne promene odziva, ali pri većim vrednostima dolazi do značjanog porasta aktivnosti amilaza i sa povećanjem temperature kultivacije i sa povećanjem vrednosti pH, pri čemu su najveće vrednosti predviđene modelom dobijene za najveću temperaturu kultivacije (35 °C) i najveću vrednost pH (6,0).

Modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti pH od 5,0, je prikazan na slici 5.20.b. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da pri konstantnoj temperaturi, sa porastom vremena kultivacije vrednost odziva prvo raste a potom opada. Sa druge strane, pri fiksnim vrednostima vremena kultivacije aktivnost amilaza raste sa porastom temperature kultivacije. Maksimalna vrednost aktivnosti amilaza prema predviđanjima modela se postiže pri najvećoj vrednosti temperature (35 °C) i većim vrednostima vremena kultivacije (5,5-7 dana).



Slika 5.20. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plavice

Uticaj vrednosti pH i vremena kultivacije predviđen modelom, na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije od 30 °C, prikazan je na slici 5.20.c. Na osnovu prikazane odzivne površine može se zaključiti da nižim vrednostima pH (4,0-5,0), sa porastom vremena kultivacije prvo dolazi do povećanja aktivnosti amilaza, a nakon toga do smanjenja. Pri većim vrednostima pH (5,0-6,0) aktivnost amilaza se povećava sa porastom vremena trajanja kultivacije. U slučaju konstantne vrednosti vremena kultivacije, sa porastom vrednosti pH raste i vrednost posmatranog odziva. Najveća aktivnost amilaza predviđena modelom, dobijena je pri najvećoj vrednosti pH (6,0) i najvećom vrednosti vremena kultivacije (7 dana).



Odstupanje od referentne tačke (kodirane vrednosti)

Slika 5.21. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na aktivnost amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Na slici 5.21 prikazan je dijagram perturbacije ispitivanih parametara, odnosno temperature kultivacije, vrednost pH i vremena kultivacije, na aktivnost amilaza nakon proizvodnje enzima solid-state tehnikom kultivacije na hranljivoj podlozi koja sadrži pšeničnu plevicu, na osnovu kog se može zaključiti da na posmatrani odziv jedini značajan uticaj ima član modela B (vrednost pH), što se slaže sa rezultatima dobijenim u tabeli 5.9. Druga dva člana modela, A (temperatura kultivacije) i C (vreme kultivacije), nemaju toliko izražen efekat, razliku između minimale i maksimalne vrednosti, kao član B u datom ispitivanom opsegu procesnih parametara.

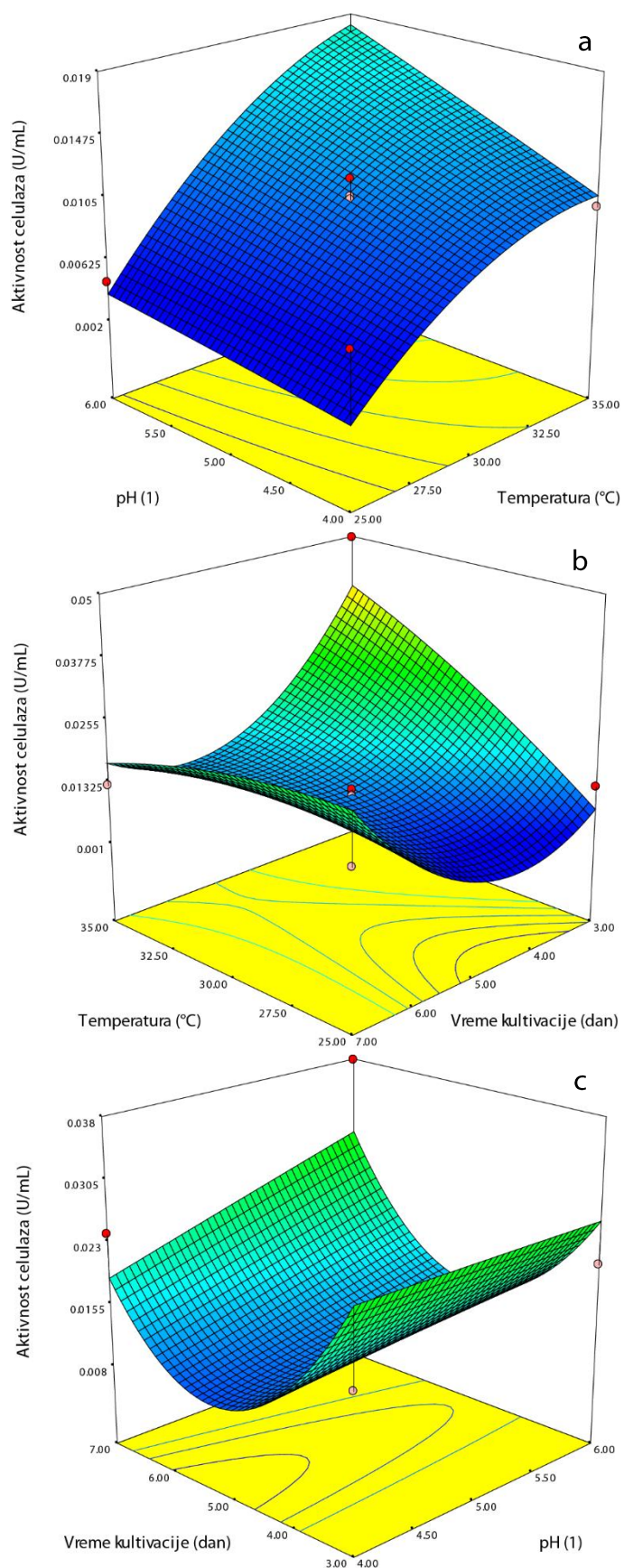
5.5.4. MATEMATIČKI MODEL ZA AKTIVNOST CELULAZA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Na slici 5.22.a se vidi uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH pri konstantnom vremenu kultivacije od 5 dana, na aktivnost celulaza kako ga predviđa model. Sa dobijene odzivne površine se može videti da pri konstantnim vrednostima temperature kultivacije sa porastom vrednosti pH blago raste i aktivnost celulaza. Međutim, pri fiksним vrednostima pH, sa porastom temperature kultivacije mnogo intenzivnije raste vrednost datog odziva. Pored toga, model predviđa maksimalnu vrednost aktivnosti celulaza za najveću primenjenu temperaturu kultivacije (35 °C) i najveću vrednost pH (6,0)

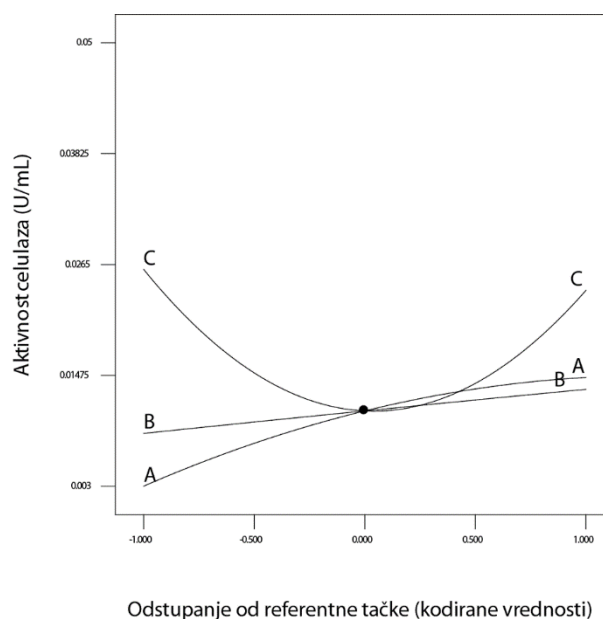
Uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri vrednosti pH od 5,0, je dat na slici 5.22.b. Sa dobijene odzivne površine može se videti da pri konstantnim vrednostima temperature kultivacije, sa porastom vremena kultivacije od 3 do 5 dana prvo dolazi do smanjenja aktivnosti celulaza, a potom daljim povećavanjem vremena kultivacije od 5 do 7 dana dolazi ponovo do povećanja posmatranog odziva ali ne u tolikoj meri kao što je bila na najmanjoj vrednosti vremena kultivacije. Kada je u pitanju konstantna vrednost vremena kultivacije, pri njenim većim vrednostima (5-7 dana) promena aktivnosti celulaza je neznatna sa promenom temperature kultivacije, ali je porast datog odziva evidentan sa porastom temperature kultivacije za niće vrednosti vremena kultivacije (3-5 dana). Aktivnost celulaza koja predstavlja maksimalnu vrednost predviđenu modelom se postiže pri najnižim vrednostima vremena (3 dana) i najvećim vrednostima temperature kultivacije (35 °C).

Slika 5.22.c prikazuje modelom predviđen uticaj vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice, pri konstantnoj vrednosti temperature kultivacije od 30 °C. Dobijeni rezultati pokazuju da pri konstantnim vrednostima vremena kultivacije ne dolaze do značajnije promene aktivnosti celulaza sa promenom vrednosti pH. Sa druge strane, pri konstantnoj vrednosti pH, granične vrednosti vremena kultivacije daju najveće vrednosti datog odziva, a centralne vrednosti daju minimalne aktivnosti celulaza. Maksimalna vrednost aktivnosti celulaza modelom je predviđena za najveću vrednost pH (6,0) i najmanju vrednost vremena kultivacije (3 dana).

Dijagram perturbacije temperature kultivacije, vrednost pH i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje enzima solid-state tehnikom kultivacije na hranljivoj podlozi koja sadrži pšeničnu plevicu, je prikazan na slici 5.23. Dobijene krive ukazuju da je posmatrani odziv osetljiv najviše na vreme kultivacije (kao što je već zaključeno u tabeli 5.9, a oblik krive, odnosno parabole ukazuje da je to u pitanju kvadratni član, C^2), zatim nešto malo temperature kultivacije, a najmanje na vrednost pH.



Slika 5.22. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

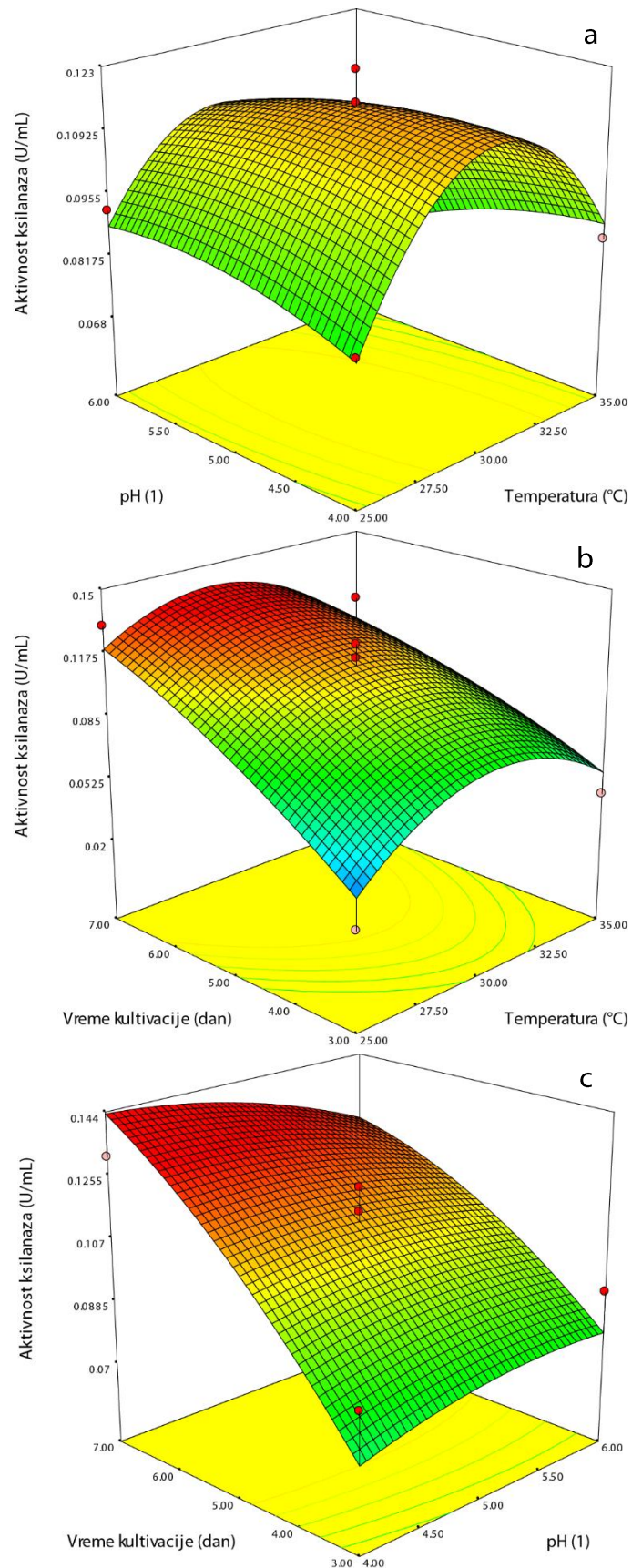


Slika 5.23. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na aktivnost celuloza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

5.5.5. MATEMATIČKI MODEL ZA AKTIVNOST KSILANAZA NAKON PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

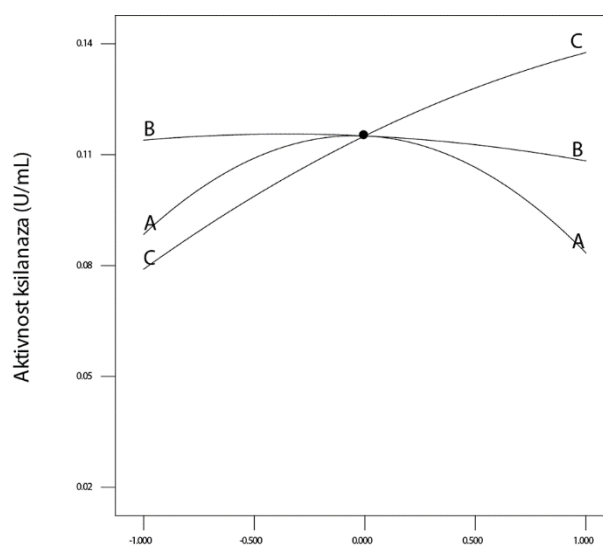
Slika 5.24.a prikazuje modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vrednosti pH na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice pri konstantnoj vrednosti vremena kultivacije od 5 dana. Dobijeni rezultati pokazuju da pri konstantnoj temperature kultivacije nema znatne promene aktivnosti ksilanaza sa promenom vrednosti pH. Međutim, pri konstantnoj vrednosti pH, vrednost posmatranog odziva raste sa porastom temperature kultivacije od 25 do 30 °C, a potom od 30 do 35 °C opada. Maksimalna aktivnost ksilanaza predviđena je u opsegu srednjih vrednosti temperature kultivacije (oko 30 °C) i najniže vrednosti pH (4,0).

Modelom predviđen uticaj temperature kultivacije i vremena kultivacije, pri vrednosti pH od 5,0, na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice se može vidjeti na slici 5.24.b. Dobijeni rezultati pokazuju da pri fiksnim vrednostima temperature dolazi do porasta aktivnosti celuloza ako se poveća vreme kultivacije. Sa druge strane, pri konstantnim vrednostima vremena kultivacije, granične vrednosti temperature daju minimalne aktivnosti ksilanaza, dok centralne vrednosti temperature kultivacije daju maksimalne vrednosti datog odziva. Prema predviđanjima modela, maksimalna aktivnost ksilanaza se dobija pri središnjoj vrednosti temperature (oko 30 °C) i najdužem vremenu kultivacije (7 dana).



Slika 5.24. Uticaj: (a) temperature kultivacije i vrednosti pH, (b) temperature kultivacije i vremena kultivacije, (c) vrednosti pH i vremena kultivacije na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Zavisnost aktivnosti ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice od vrednosti pH i vremena kultivacije, pri konstantnoj temperaturi kultivacije od 30 °C je prikazan na slici 5.24.c. Dobijena odzivna površina ukazuje da u celom primenjenom opsegu vremena kultivacije, sa promenom vrednosti pH ne dolazi do značajne promene posmatranog odziva, sem pri višim vrednostima vremena kultivacije kada sa smanjenjem vrednosti pH dolazi do blagog porasta aktivnosti ksilanaza. Međutim, za fiksne vrednosti pH dolazi do značajnog porasta aktivnosti ksilanaza sa porastom vremena kultivacije. Maksimalna modelom predviđena vrednost aktivnosti ksilanaza se dobija primenom najniže vrednosti pH (4,0) i najdužeg vremena kultivacije (7 dana).



Odstupanje od referentne tačke (kodirane vrednosti)

Slika 5.25. Perturbacija ispitivanih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Dijagram perturbacije, prikazan na slici 5.25, pokazuje efekat svih parametara na odziv aktivnosti ksilanaza. Promene u dozivu koje se javljaju odstupanjem od referentne (centralne) tačke ukazuju na uticaj datog parametra na ispitivani odziv.

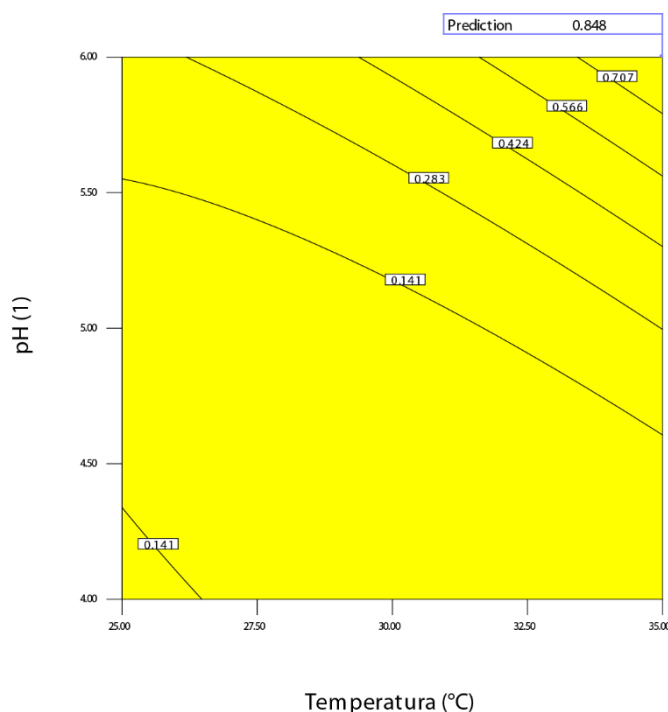
Drugim rečima, početna temperatura i vreme kultivacije su najznačajniji, odnosno imaju najuticajniji efekti, dok je vrednost pH najmanje značajan efekat, što se slaže sa tabelom 5.9. Može se učiti da pomenuti efekti u zavisnosti od oblika krive imaju i odgovarajući efekat. Tako kvadratni član temperature kultivacije ima oblik parabole odnosno postoji vrednost temperature u ispitivanom opsegu na kojoj odziv dostiže svoju maksimalnu vrednost. Sa druge, strane pravolinijski oblik krive za član vremena kultivacije pokazuje linearnu zavisnost između datog parametra i ispitivanog odziva.

5.5.6. OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA SOLID-STATE TEHNIKOM KULTIVACIJE IZ PŠENIČNE PLEVICE

Za optimizaciju kulture plesni solid-state tehnikom kulture na podlozi čija je osnova pšenična plevica, odabrani odzivi su ukupan sadržaj proteina i aktivnosti dobijenih hidrolitičkih enzima. S obzirom da plesan *Trichoderma reesei* tokom kulture sintetiše enzime koji razlažu složeni supstrat do prostih šećera, neophodno je postići maksimalno moguću količinu enzima sa što većom aktivnošću uz minimalan utrošak supstrata i energije.

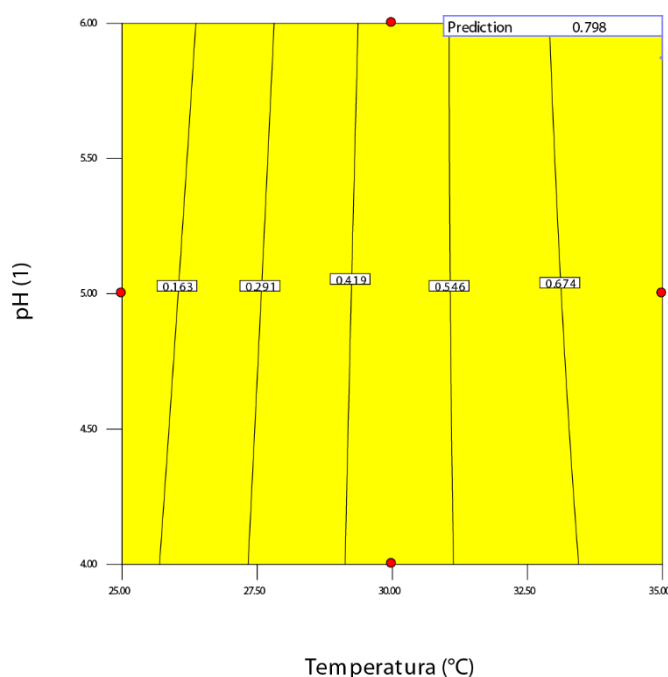
Prema navedenom, cilj optimizacije je odabir temperature kulture, vrednosti pH i vremena kulture za koje će odabrani odziv ukupnog sadržaja proteina i aktivnosti hidrolitičkih enzima (amilaza, celuloza i ksilanaza) biti maksimalan.

Na slici 5.26 su prikazani rezultati optimizacije eksperimentalnih vrednosti. Cilj je bio da se utvrdi zavisnost vrednosti željene funkcije za aktivnost amilaza od temperature kulture, vrednosti pH i vremena kulture nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kulture iz pšenične plevice. Maksimalna vrednost željene funkcije koja iznosi 0,848 se postiže pri temperaturi kulture 34,5-35,0 °C, vrednosti pH 5,8-6,0 i vremenu kulture 6,1-6,5 dana.



Slika 5.26. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za aktivnost amilaza od temperature kulture, vrednosti pH i vremena kulture nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kulture iz pšenične plevice

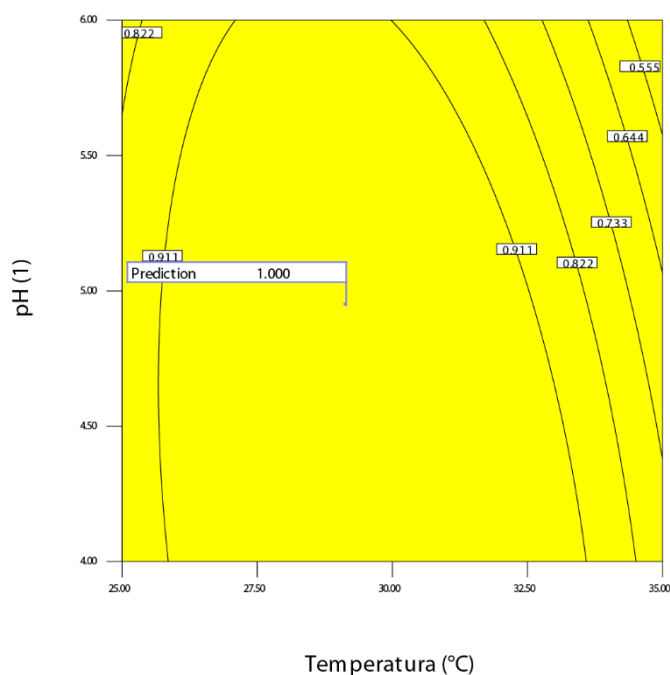
Zavisnost vrednosti željene funkcije za aktivnost celulaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice je data na slici 5.27. U cilju postizanja maksimalne, odnosno najveće aktivnosti celulaza, vrednost temperature kultivacije treba da bude oko 35 °C, vrednost pH 5,7-6,0, a vreme kultivacije u opsegu 3,0-3,2 dana. Pod ovim uslovima vrednost željenje funkcije iznosi 0,798.



Slika 5.27. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za aktivnost celulaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Vrednost željene funkcije za maksimalnu aktivnost ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice je prikazana na slici 5.32. U definisanim opsezima ispitivanih parametara, variranjem temperature kultivacije u intervalu 28-30 °C, vrednosti pH 5,0-5,3 i vremena kultivacije od 6,4 do 6,6 dana, vrednost ukupne željene funkcije je maksimalan i iznosi 1,000.

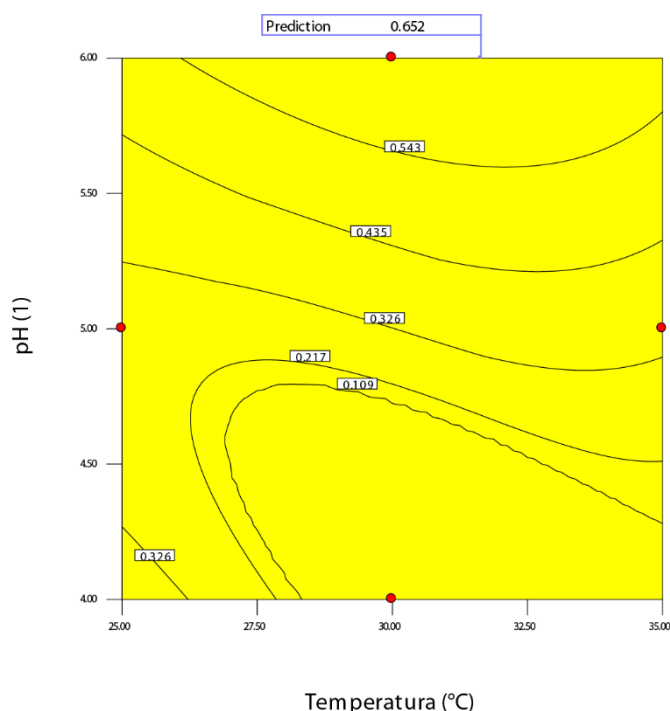
U tabeli 5.11 su prikazani svi rezultati optimizacije proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice. Konačno, rezultat optimizacije (ispitivanih parametara u zadatim opsezima), sa ciljem postizanja maksimalno mogućeg ukupnog sadržaja proteina uz maksimalnu aktivnost svih prisutnih hidrolitičkih enzima, prikazan je i poslednjem redu tabele 5.11, a grafik željene funkcije na slici 5.29. Maksimalna vrednost željene funkcije od 0,652 postiže se pri vrednostima temperature od 31,64, vrednosti pH 6,00 i vremena kultivacije 7 dana.



Slika 5.28. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za aktivnost ksilanaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Tabela 5.11. Rezultati optimizacije proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice (A – aktivnost amilaza, C – aktivnost celulaza, K – aktivnost ksilanaza i P – ukupan sadržaj proteina)

Kriterijum optimizacije				Optimalne vrednosti			Predviđanje modela			
A	C	K	P	T (°C)	pH (1)	t (dan)	A (U/mL)	C (U/mL)	K (U/mL)	P (mg/mL)
*				35,00	6,00	6,33	0,1845	0,0185	0,0755	0,6130
	*			35,00	5,87	3,00	0,1149	0,0406	0,0511	0,6192
		*		29,58	5,19	6,55	0,0511	0,0194	0,1328	0,5206
			*	30,80	6,00	7,00	0,1188	0,0280	0,1201	0,6671
*			*	35,00	6,00	7,00	0,1823	0,0234	0,0761	0,6387
	*		*	35,00	6,00	3,00	0,1289	0,0407	0,0498	0,6407
		*	*	29,09	6,00	7,00	0,0996	0,0290	0,1262	0,6624
*	*			35,00	6,00	3,00	0,1289	0,0407	0,0498	0,6407
*		*		32,67	6,00	6,68	0,1461	0,0229	0,1048	0,6435
	*	*		28,02	6,00	7,00	0,0895	0,0293	0,1265	0,6547
*	*		*	35,00	6,00	3,00	0,1289	0,0407	0,0498	0,6407
*		*	*	32,38	6,00	7,00	0,1400	0,0266	0,1083	0,6631
	*	*	*	28,67	6,00	7,00	0,0955	0,0291	0,1266	0,6599
*	*	*	*	31,64	6,00	7,00	0,1297	0,0273	0,1146	0,6660



Slika 5.29. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije za ukupan sadržaj proteina, aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza od temperature kultivacije, vrednosti pH i vremena kultivacije nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

Dobijene vrednosti optimuma za submerznu i solid-state kultivaciju su upotrebljene za dodatni set eksperimenata radi validacije dobijenih modela. Rezultati ovih eksperimenata, a koji su prikazani u tabeli 5.12, potvrđuju valjanost modela i mogućnost njihove dalje primene u modelovanju i simulaciji biprocesa proizvodnje hidrolitičkih enzima iz pšenične plevice, što je i urađeno u narednoj fazi disertacije.

Tabela 5.12. Validacija modela optimizacije ispitivanih procenih parametara (temperatura kultivacije, vrednost pH i vreme kultivacije) na posmatrane odzive (ukupan sadržaj proteina i aktivnosti hidrolitičkih enzima) nakon submerzne i solid-state kultivacije na pšeničnom plevici (SmF – submerzna tehnika kultivacije, SSF – solid-state tehnika kultivacije, A – aktivnost amilaza, C – aktivnost celulaza, K – aktivnost ksilanaza i P – ukupan sadržaj proteina)

Tehnika kultivacije	Vrsta rezultata	Optimalne vrednosti			Odzivi			
		T (°C)	pH (I)	t (dan)	A (U/mL)	C (U/mL)	K (U/mL)	P (mg/mL)
SmF	Model	30,26	4,06	7,00	0,2157	0,0510	0,1655	1,1634
	Eksperiment	30,26	4,06	7,00	0,2328	0,0549	0,1703	1,1589
SSF	Model	31,64	6,00	7,00	0,1297	0,0273	0,1146	0,6660
	Eksperiment	31,64	6,00	7,00	0,1305	0,0284	0,1398	0,6802

5.6. MODEL BIOPROCESA PROIZVODNJE HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ NUSPROIZVODA PRERADE ŽITA

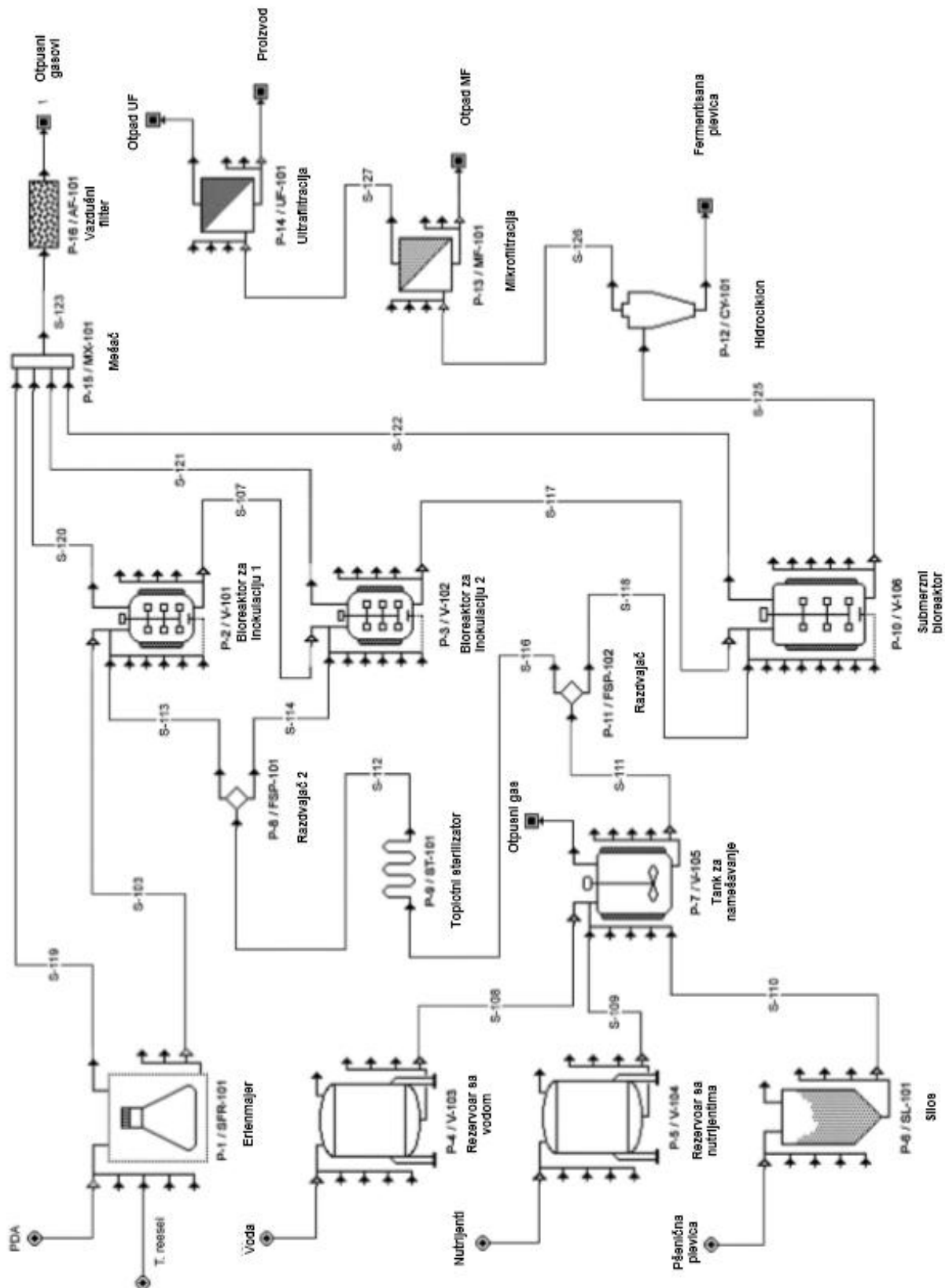
5.6.1. OPIS MODELA BIOPROCESA

U skladu sa definisanim ciljem ove disertacije, SuperPro Designer (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ, USA) je primenjen za generisanje modela bioprocasa proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom i solid-state tehnikom kultivacije. Razvijeni model za proizvodnju enzima submerznom tehnikom kultivacije je prikazan na slici 5.30, dok je model proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije prikazan na slici 5.31.

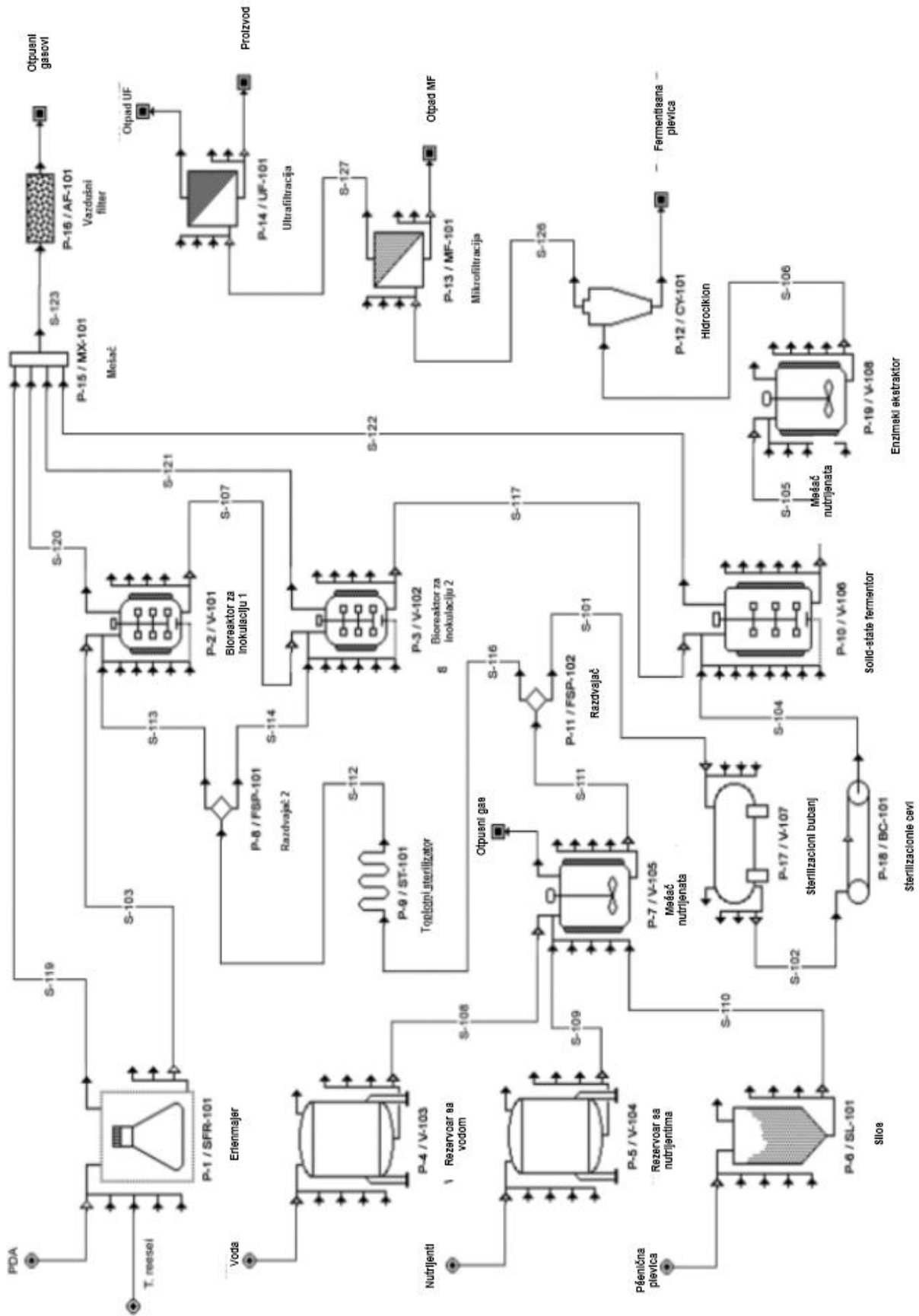
U procesu proizvodnje submerznom tehnikom kultivacije proizvodni mikroorganizam *Trichoderma reesei*, koji je bio zamrznut, je prenesen u prethodno sterilisan erlenmajer koji sadrži tečnu podlogu namenjenu za osvežavanje mikroorganizma. Sa ekonomskog aspekta cena opreme i podloge za osvežavanje je zanemarljiva u odnosu na druge troškove bioprocasa. Nakon osvežavanja mikroorganizma, kultura se iz erlenmajera prenosi u bioreaktor za inokulaciju 1 u kome se nalazi hranljiva podloga koja kao osnovu sadrži pšeničnu plevicu. Hranljiva podloga se sastoji iz vode, nutrijenata i pšenične plevice kao glavnog sastojka. Voda i nutrijenti se skladište u posebnim tankovima, a pšenična plevica je pripremljena u posebnom silosu. Svi delovi podloge su prebačeni u tank za namešavanje koji pored tokova za ulaz i izlaz sirovina sadrži i ventil za otpust proizvedenih gasova. Tako namešana podloga se transportuje i razdvaja na onu koja je potrebna za umnožavanje proizvodnog mikroorganizma u bioreaktorima za inokulaciju 1 i 2 i onu koja je potrebna za bioreakciju u submerznom/solid-state bioreaktoru. Deo podloge koji je namenjen za pripremu inokuluma se pre ulaska u bioreaktore za pripremu inokuluma sterilise pomoću toplote. Razlika između bioreaktora za inokulaciju 1 i bioreaktora za inokulaciju 2 je ta što drugi bioreaktor ima veće razmere. Drugi deo podloge namenjen za bioreakciju se prenosi u submerzni bioreaktor. Svi gasovi proizvedeni tokom pripreme inokuluma i kultivacije se namešavaju a zatim propuštaju kroz vazdušni filter.

Proizvod nastao u submerznom bioreaktoru je smeša amilaza, celulaza i ksilanaza, ostataka od bioreakcije i vode. Nakon proizvodnje enzimi se odvajaju pomoću hidrociklona. Tečni deo odvojen u hidrociklonu se prenosi na mikrofiltraciju i ultrafiltraciju kako bi se enzimi koncentrisali, dok se ostatak odbacuje (osnovni slučaj).

Solid-state proces se od submerznog razlikuje po tome što se podloga nakon namešavanja sterilise pomoću sterilizacionog bubnja i transportuje pomoću sterilnog transportera. Pored toga, solid-state proces sadrži dodatan korak, a to je enzimska ekstrakcija koja se dešava pre prenosa sadržaja iz solid-state bioreaktora u hidrocilikon.



Slika 5.30. Pojednostavljen model za proizvodnju hidrolaza pomoću submerzne fermentacije pšenične plevice



Slika 5.31. Pojednostavljen model za proizvodnju hidroliza pomoću solid-state fermentacije pšenične plevice

5.6.2. SPECIFIKACIJA MODELA BIOPROCESA

Veličina postrojenja. Predloženi model bioprocesa je projektovan tako da se nalazi u blizini jednog domaćeg mlina. Podaci iz 2018. godine za ovaj mlin ukazuju da se od $2,4 \times 10^6$ tona pšenice dobija oko 10^6 kg pšenične plevice kao otpada. Oprema za proizvodnju enzima je projektovana tako da može da obradi ovu količinu otpada. Smanjenjem razdaljine između domaćeg mlina i fabrike za proizvodnju enzima smanjuje se i cena za transporta sirovine. Što znači da ako bi vlasnici mlina rešili da se bave i proizvodnjom enzima cena sirovine (pšenična pčevica) bi bila vrlo mala.

Kultivacija u erlenmajeru. PDA (eng. Potato Dextrose Agar - krompirov dekstrozni agar) je hranljiva podloga koja se koristi za osvežavanje proizvodnog mikroorganizma (Castro i sar., 2010). Erlenmajer je prethodno sterilisan na 121°C . Nakon hlađenja do sobne temperature podloga je zasejana proizvodnim mikroorganizmom *Trichoderma reesei* QM 9414. Nakon 48 h kultivacije (30°C i 200 rpm) cela zapremina pripremljenog inokuluma se prebacuje u bioreaktor za inokulaciju 1. Proizvodni soj je uveden u model iz baze podataka čistih komponenti programa, gde već postoji standardna komponenta „Biomass“.

Bioreaktor za inokulaciju 1. Voda, nutrijenti i pšenična plevica su namešani u tanku za namešavanje (3 g/100mL pšenične plevice, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 1,36% K_2HPO_4). Vrednost pH je podešena na $4,5 \pm 0,1$ dodavanjem NaOH ili H_2SO_4 . Namešana podloga je zatim prenosi kroz sterilizator gde se sterilizacija vrši toplotom. Sterilna podloga se zatim transportuje do bioreaktor za inokulaciju 1 gde se namešava sa inokulumom iz erlenmajera. Nakon 48 h čitav inokulum se transportuje u bioreaktor za inokulaciju 2.

Pšenična plevica je uvedena u program kao smeša 54% čiste celuloze (što čini zamenu za 36% celuloznog i 18% hemiceluloznog sastava u stvarnosti), 16% lignina, 4,6% proteina i 6,9% pepela, sa sadržajem suve materije od 91,1% prema rezultatima analiza sastava pšenične plevice u tabeli 5.1. S obzirom da voda, pepeo i proteini već postoje u bazi podataka programa, neophodno je bilo napraviti celuloze i lignin kao komponente. Za celulozu, upotrebljena je molekulska masa od 162,14 g/mol po jedinici glukoze, zajedno za molekulskom formulom $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ i entalpijom $-2.830,15$ kJ/mol prema Blokhin i sar. (2012). Molekulska formula za lignin je podešena na $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ sa molekulskom masom od 193,4 g/mol i entalpijom $-1.628,6$ kJ/mol prema Voitkevich i sar. (2012). Hidrolitički enzimi su uvedeni u program iz njegove baze podataka (čiste komponenta protein) uz izmenu naziva jedinjenja „aktivni enzim“ ili „inaktivni enzim“ s obzirom na potrebe i jednog i drugog oblika u simulaciji.

Bioreaktor za inokulaciju 2. Operacije su iste, a razlika je u povećanju razmera bioreaktora za inokulaciju 2 u odnosu na bioreaktor za inokulaciju 1.

Submerzni/solid-state bioreaktor. Namešana podloga (pšenična plevica, nutrijenti i voda) se prenosi iz tanka za namešavanje u bioreaktor a zatim sterilise. Nakon hlađenja, u submerzni bioreaktor se prenosi inokulum iz bioreaktora za inokulaciju 2 koji sadrži 10^7 spora po mL ili gramu pšenične plevice. Priprema (sadržaj vlage 70%) i sterilizacija podloge za solid-state bioreaktor se vrši u sterilizatoru tipa bubnja, nakon čega se prebacuje pomoću sterilnog transportera u solid-state bioreaktor. Nakon 7 dana fermentacije (pri optimalnim parametrima temperature i vrednosti pH u zavisnosti od tehnike kultivacije, a na osnovu podataka optimizacije iz prethodnog dela) čitav sadržaj iz bioreaktora se prebacuje u hidrociklon.

Proces fermentacije je definisan kao stehiometrijski i pojednostavljen prema Jourdier i sar. (2012). Na osnovu poznavanja količine nastalih enzima u eksperimentalnom delu disertacije i kinetičkih parametara definisanih od strane Jourdier i sar. (2012) definisani su stehiometrijski koeficijent za sve glavne komponente koje učestvuju u bioprocusu unutar fermentora.

Izdvajanje i prečišćavanje proizvoda. Celokupan sadržaj iz submerznog bioreaktora se prebacuje u hidrociklon kako bi se uklonile čvrste materije od ekstrakta (80%). U solid-state bioprocusu enzimi se pre prenosa u hidrociklon ekstrahuju vodom. Tečni deo se šalje na mikrofiltraciju i ultrafiltraciju. Pretpostavljeno je da je ukupna koncentracija enzima oko 50%(m/m) (de Castro i sar., 2010). Denaturacija enzima koja se dešava tokom filteracija se odvija proporcionalno prema svim grupama enzima i ona je podešena na 5% za mikrofiltraciju i 2% za ultrafiltraciju. Ovi procenti su dobijeni na osnovu eksperimenata koje je su uradili Mores i sar. (2001).

Vazdušni filteri. Svi gasovi proizvedeni u bioreaktorima za pripremu inokuluma i u bioreaktoru u kom se odvija fermentacija se pre otpuštanja u vazduh propuštaju kroz vazdušni filter, dok se gasovi nastali tokom namešavanja podloge otpuštaju direktno u atmosferu.

Troškovi sirovine. Troškovi većine sirovina koje se koriste za simulaciju dobijeni su iz baze podataka Zavoda za Statistiku Republike Srbije (<http://publikacije.stat.gov.rs/G2018/Pdf/G20181146.pdf>). Troškovi vode obračunati su na osnovu podataka Kwiatkoski i sar. (2006). Pretpostavljena cena pšenične plevice iznosi 0,3085 \$/kg i ona je dobijena od lokalnih dobavljača.

Komunalne usluge. Voda za hlađenje (ulazna temperatura 15°C, izlazna temperatura 25°C), rashlađena voda (ulazna temperatura 5°C, izlazna temperatura 10°C), para (ulazna temperatura 152°C) i električna energija su komunalije potrebne za bioprocus. Njihovi troškovi su definisani pomoću SuperPro Designer (0,05 \$/MT, 0,40 \$/MT, 12,00 \$/MT i 0,10 \$/kVh, redosledom).

Ekonomska analiza. Izgradnja postrojenja je planirana za 2018. godinu. Izgradnja treba da traje 24 meseca plus jedan mesec za probni rad i validaciju proizvodnje. Ukupan životni vek projekta (uključujući i izgradnju) je 20 godina, a godišnja stopa inflacije (3%) zasniva se na vrednostima predviđenim za Srbiju u narednim godinama. Period amortizacije je 18 godina. Troškovi za izgradnju objekata nisu uzeti u obzir kao ni troškovi za reklamiranje proizvoda.

Ciljevi ekonomske analize su da se odredi cena proizvodnje enzima tradicionalnom submerznom metodom i solid-state metodom, u jedinicama dolar po kilogramu proizvoda, kao i profitabilnost postrojenja za proizvodnju enzima korišćenjem obe tehnike pomoću tri indikatora: period otplate, neto sadašnja vrednost i interna stopa povrata. Ova dva cilja ostvaruju se identifikacijom troškova opreme i ekonomskih parametara koji se koriste kao ulazni parametri za simulacioni softver. Ekonomske stavke (cena direktnog fiksnog kapitala, operativni troškovi i godišnji neto promet novca) su izračunate na osnovu ulaznih parametara. Prvi cilj ukazuje na jedinične troškove koji su određeni pomoću softverskih simulatora izlaznih parametara. Ovo omogućava poređenje troškova parametara između dve tehnike kultivacije bez uzimanja u obzir prodajne cene krajnjeg enzimskog preparata. Drugi cilj se odnosi na tri profitabilna indikatora (period otplate, neto sadašnja vrednost i interna stopa povratka) koji su preračunati korišćenjem podataka za cenu enzimske proizvodnje i prodajnu cenu krajnjeg proizvoda.

Cena kupovine većih delova opreme je dobijena na osnovu ponuda dobavljača opreme ili iz literature. Ako se veličina opreme u modelu nije slagala sa veličinom opreme ponuđenom od strane dobavljača, cena opreme je korigovana primenom pravila prikazanog sledećom jednačinom (Vučurović, 2015):

$$C_B = C_A \cdot \left(\frac{S_B}{S_A} \right)^{0,6}$$

gde C_B predstavlja procenjenju cenu (\$) opreme veličine S_B (L, m³, itd.), a C_A je poznata cena (\$) opreme odgovarajuće veličine S_A (iste jedinice kao S_B). Pored veličine, vrsta konstrukcionog materijala i specifične karakteristike opreme znatno utiču na troškove kupovine opreme (Nghiem i sar., 2011).

Prilagođavanje kapitalnih i operativnih troškova. Na osnovu podataka dobijenih od Kwiatkowski i sar. (2006) u tabeli 5.13 direktni fiksni kapital (DFK) postrojenja se procenjuje na osnovu ekonomskog parametra za kapitalne investicije koji je izražen kao procenat cene glavnih jedinica opreme. Troškovi radne snage uključuju četiri radnika za tehničke poslove (5 \$/h) i jednog supervizora (10 \$/h). Operativni troškovi su podešeni tako da imaju vrednost dovoljnu da pokriju sve troškove postrojenja koji obuhvataju radnu snagu, sirovine, komunalne usluge i tretman otpada za 30 dana rada. Prve dve šarže proizvodnje pripisane su pokretanju bioprocesa i testovima za validaciju, pa su njihovi troškovi uzeti u obzir u odnosu na ukupan broj šarži tokom celog životnog veka postrojenja. Godišnja stopa održavanja opreme iznosi 2% direktnog fiksnog kapitala, dok maksimalni radni godišnji period iznosi 330 dana.

Tabela 5.13. Ekonomski faktori za procenu kapitalnih troškova za oba modela za dobijanje hidrolaza iz pšenične plevice

Stavka	Faktor	Osnovna jedinica
Cevi	= 0,35 x	Troškovi nabavke
Instrumentacija	= 0,40 x	Troškovi nabavke
Izolacija	= 0,03 x	Troškovi nabavke
Elektro instalacije	= 0,10 x	Troškovi nabavke
Građevine	= 0,45 x	Troškovi nabavke
Poboljšanje površine	= 0,15 x	Troškovi nabavke
Pomoćni objekti	= 0,40 x	Troškovi nabavke
Troškovi nabavke opreme koja se ne nalaze na listi	= 0,20 x	Troškovi nabavke
Troškovi instalacije opreme koja se ne nalaze na listi	= 0,50 x	Troškovi nabavke opreme koja se ne nalaze na listi
Održavanje	= 0,06 x	Troškovi direktnog fiksnog kapitala
Osiguranje	= 0,01 x	Troškovi direktnog fiksnog kapitala
Lokalne takse	= 0,02 x	Troškovi direktnog fiksnog kapitala
Fabrički troškovi	= 0,05 x	Troškovi direktnog fiksnog kapitala
Laboratorija/QC/QA	= 0,15 x	Ukupan trošak radne snage

Izvor: Vučurović i sar. (2012)

QC = Kontrola kvaliteta; QA = Analiza kvaliteta

5.6.3. SIMULACIJA OSNOVNOG SLUČAJA

Prve simulacije bioprocesa su sprovedene za osnovni scenario u kom je bilo prisutno samo po jedan komad opreme od svakog uređaja i uz pretpostavku da je tok krajnjeg prečišćenog enzima jedini izvor prihoda (istrošena/fermentisana plevica se smatra otpadom). Stoga su fermentisana plevica, mikrofiltracioni otpad i ultrafiltracioni otpad tretirani kao otpadni tokovi sa troškovima za odlaganje od 0,0005 \$/kg, za svaki pojedinačni tok. Centrifugalne pumpe korišćene za transport tečnog toka nisu prikazane na slikama 5.30 i 5.31, ali su uključene u ekonomsku analizu.

Simulacija i analiza tokova potvrdili su eksperimentalne rezultate i ukazali da je glavni korak fermentacije usko grlo procesa. Ukupno trajanje ovog segmenta po šarži iznosi 172 časa (nešto više od 7 dana jer obuhvata i punjenje bioreaktora sirovinom, mikroorganizmima, vodom i CIP/SIP) tako da su ostali delovi postrojenja bili neaktivni i njihov period rada se određuje na osnovu glavne faze bioprocasa. Iz analize uskog grla ukazano je na potrebu uvođenja jednog dodatnog submerznog ili solid-state bioreaktora u postrojenje (koji radi u smaknutom režimu rada u odnosu na prvi bioreaktor).

Uzimajući u obzir ovu izmenu, kod bioreaktora za inokulaciju 1 i 2 su smanjena vremena mirovanja sa 18,5% na 5,6% i sa 14,9% na 5,8%, od ukupnog operativnog vremena po šarži. Uvođenjem jednog dodatnog bioreaktora poboljšano je iskorišćenje opreme i smanjeno je trajanje šarže sa 318 na 312,5 sati, a ukupan broj šarži se godišnje povećao sa 42 na 48. Uzimajući u obzir da su ova istraživanja izvedena sa konstantnom količinom pšenične plevice koja se obradi na godišnjem nivou, povećan broj šarži nakon modifikacije rezultirao je smanjenjem opreme i ukupnih kapitalnih investicija za 15%.

5.6.4. SIMULACIJA SA KOPROIZOVDNJOM

Kako bi se procenilo da li se ekonomski učinak postrojenja može dodatno poboljšati, fermentisana plevica, koja se u prethodnom (osnovnom) slučaju posmatrala kao otpad je ispitana kao potencijalni sporedni proizvod. Da bi se omogućila njegova komercijalizacija kao stočne hrane, pretpostavljeno je povećanje koncentracije proteina od 2% usled fermentacije što je zasnovano na eksperimentalnim podacima (Belyea i sar., 2003) koji su dobijeni za agroindustrijski materijal obogaćenim proteinima primenom mikroorganizmima. Fermentisana plevica je stoga uzeta u razmatranje kao jedan od izvora prihoda. Prodajna cena fermentisane plevice definisana je na osnovu povećanja sadržaja proteina od 2%, tako da je procenjena prodajna cena 0,281 \$/kg. Pošto je količina koprodukta velika, moguće je napraviti profit, što umanjuje jedinične troškove proizvodnje enzima.

5.6.5. EKONOMSKA ANALIZA

Troškovi opreme. Procena troškova opreme za proizvodnju enzima primenom submerzne i solid-state tehnike kultivacije, redosledom, je prikazana u tabeli 5.10. Vrednosti svih drugih tehničkih parametara nalaze se u okviru programa. Kako novi i precizniji podaci postaju dostupni u budućnosti, ove informacije mogu biti unete u program kako bi se dobili još precizniji rezultati.

Kao što se vidi iz tabele 5.14, iako solid-state proces sadrži dodatne delove opreme (sterilizacioni bubanj, sterilizacioni transportere i enzimski ekstraktor) troškovi opreme su znatno niži od submerznog procesa. Glavna razlika je u samom centru bioprocasa, tačnije

bioreaktoru koji se koristi u submerznom procesu je mnogo kompleksniji i skuplji. Na osnovu specifikacija koje su prikazane u tabeli 5.14 i ekonomskih faktora koji su prikazani u tabeli 5.13, direktni troškovi fiksnog kapitala su procenjeni i prikazani u tabeli 5.15. Očekivano je da su direktni troškovi kapitala niži za solid-state bioproces, s obzirom da su sve stavke iz tabele 5.15 nekako povezane i izražene kao funkcije troškova nabavke opreme što je standardna praksa u modelovanju procesa.

Tabela 5.14. Specifikacije i cena opreme za proizvodnju hidrolitičkih enzima iz pšenične plevice primenom submerzne i solid-state tehnike kultivacije

Naziv jedinice	Veličina	Cena (\$)	
		Submerzno	Solid-state
Bioreaktor za inokulaciju 1	1,42 m ³	5.000	5.000
Bioreaktor za inokulaciju 2	142,15 m ³	80.000	80.000
Tank za namešavanje	2.000,00 m ³	250.000	250.000
Toplotni sterilizator	118,57 L/h	98.000	98.000
Silos	800,00 m ³	10.000	10.000
Skladište za vodu	1.500,00 m ³	43.000	43.000
Skladište za nutrijente	500,00 m ³	18.000	18.000
Vazdušni filter	11,02 L/h	4.000	4.000
Submerzni bioreaktor	15.104,35 m ³	3.105.000	-
Solid state-bioreaktor	2.803,00 m ³	-	735.000
Sterilizacioni bubanj	2.803,00 m ³	-	162.000
Sterilizacioni transporter	20,00 m	-	79.000
Enzimski ekstraktor	15.000,00 m ³	-	1.530.000
Hidrociklon	20.571,00 L/h	77.000	77.000
Mikrofiltrat	1.947,00 L/h	150.000	150.000
Ultrafiltrat	162,00 L/h	147.000	147.000
Oprema koja se nalazi na spisku		3.987.000	3.316.000
Oprema koja se ne nalazi na spisku (0.25 x Oprema koja se nalazi na spisku)		980.000	996.750
Ukupno		4.983.750	4.145.000

Cena fermentacije u erlenmajeru je zanemarljiva.

Operativni troškovi. Operativni troškovi su izračunati i jednaki su zbiru sledećih stavki navedenih u programu: sirovine, troškovi radne snage, troškovi objekta, laboratorija/QC/QA, komunalne usluge i ostali troškovi.

Tabela 5.15. Procena direktnih fiksnih kapitalnih troškova za proizvodnju hidrolitičkih enzima submerznom i solid-state kultivacijom iz pšenične plevice (cena u \$)

Jedinica	Submerzno	Solid-state
Cena osnovne opreme	4.983.750	4.145.000
Instalacije	1.495.125	1.243.500
Cevi	1.744.313	1.450.750
Instrumentacija	1.993.500	1.658.000
Izolacija	149.513	124.350
Električna energija	498.375	414.500
Građevine	2.242.688	1.865.250
Poboljšanje okolne površine	747.563	621.750
Pomoćni objekti	1.993.500	1.658.000
Ukupan trošak	15.848.325	13.181.100
Inženjerstvo	3.962.081	3.295.275
Konstrukcija	5.546.914	4.613.385
Ukupan indirektan trošak	9.508.995	7.908.660
Naknada za izvođače radova	1.267.866	1.054.488
Nepredvidiva stanja	2.535.732	2.108.976
Drugi ukupan trošak	3.803.598	3.163.464
Ukupan direktan kapitalni trošak	29.160.918	24.253.224

Analiziranjem upotrebe i cene sirovina može se zaključiti da je submerzna tehnika zahtevnija što se tiče potrošnje vode, i da više košta u odnosu na solid-state tehniku za proizvodnju enzima. Četiri različite komunalije se ispituju u procesima proizvodnje enzima a to su električna energija, grejna para, voda za hlađenje i rashlađena voda. Analize su pokazale da submerzna tehnika zahteva mnogo više vode za hlađenje i struje, što kao rezultat ima veću cenu submerzne tehnike.

Ukupna cena radne snage se izračunava kao zbir radne snage prema tipu (operator, supervizor) pomnožen sa stopom radne snage prema tipu. Prema stopi radne snage i potrebnoj radnoj snazi koja je spomenuta u prethodnom tekstu, godišnji troškovi rada, odnosno radne snage su otprilike jednaki u oba slučaja.

Troškovi koji zavise od objekta obračunavaju amortizaciju direktnih troškova fiksnog kapitala, održavanje opreme, osiguranje, lokalne poreze i drugih eventualnih fabričkih troškova. Stavka amortizacije se obračunava korišćenjem metode linearne amortizacije, uzimajući u obzir deo ušteđevine od direktnog fiksnog kapitala, za koji se u ovoj analizi pretpostavlja da iznosi 5%. Faktorska metoda se koristi za procenu održavanja opreme, osiguranja, lokalnih poreza i drugih fabričkih troškova, odnosno na osnovu direktnog fiksnog kapitala (faktori prikazani u tabeli 5.13).

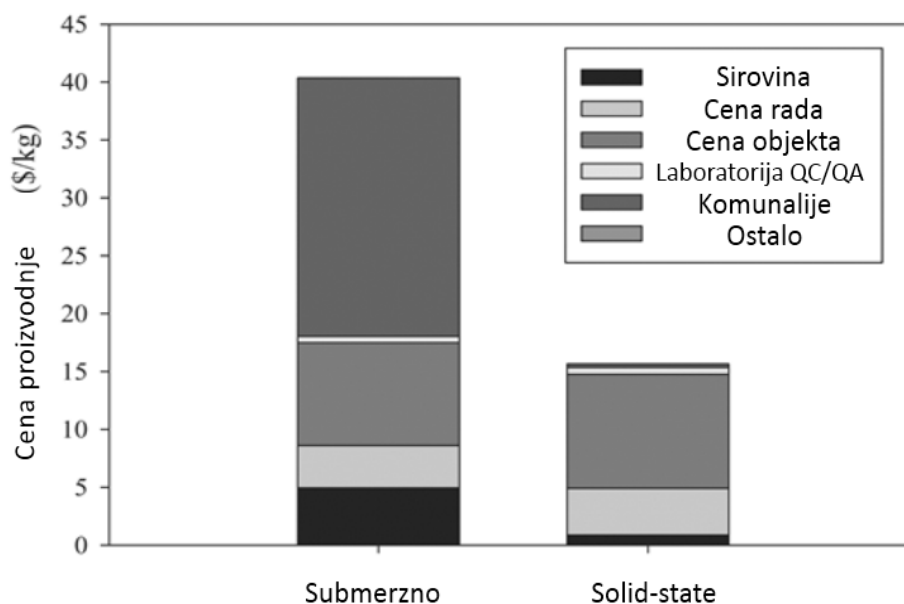
Troškovi vezani za Laboratoriju/QC/QA obračunavaju troškove off-line analize i troškove kontrole kvaliteta. U slučaju njihova vrednost je procenjena na oko 15% od ukupnih troškova radne snage.

Ostali operativni troškovi uključuju troškove istraživanja i razvoja, troškove validacije procesa i druge, koji su procenjeni kao nulte vrednosti za submerzni i za solid-state bioproces.

Nakon sabiranja i izračunavanja svih prethodno navedenih operativnih troškova, mogu se izračunati ukupni operativni troškovi. Za proizvodnju enzima submerznim postupkom godišnji operativni troškovi iznose 30.576.000 \$, dok su za solid-state postupak operativni troškovi znatno niži (8.231.000 \$). Ovo je takođe uzrokovano činjenicom da je za submerzni proces potrebno mnogo više uložiti novca u komunalne usluge.

Jedinični troškovi proizvodnje. Jedinični troškovi za svaki od načina proizvodnje hidrolitičkih enzima se određuju kao količnik godišnjih operativnih troškova i godišnje količine proizvedenog enzima. Količina proizvedenog enzima je proizvod izlazne količine po šarži i broj šarži na godišnjem nivou. Jedinična cena proizvodnje kod submerznog bioprocesa iznosi 39,58 \$/kg, dok za solid-state bioproces iznosi 14,35 \$/kg. Da bi se izvršila analiza jediničnih troškova proizvodnje, udeo jediničnih troškova sastoji se iz šest delova (sirovina, cena radne snage, cena objekta, laboratorija, komunalije i ostalo) i određuje se tako što se ukupni troškovi proizvodnje množe sa procentima (udelima) jediničnih operativnih troškova. Rezultati su prikazani na slici 5.32.

Kao što se vidi na slici 5.32 najznačajniji udeo u ukupnim troškovima imaju troškovi koji se odnose na komunalne usluge, dok drugi značajan trošak predstavlja sam rad odnosno radna snaga i cena objekta. Ovo je slučaj samo kada je cena pšenične plevice svedena na nulu što je moguće s obzirom na pretpostavku da fabrika koja proizvodi enzime sadrži pogon za mlvenje pšenice (mlin), i za cilj ima iskorišćenja generisanog otpada, odnosno pšenične plevice. U svakom drugom slučaju, sirovina bi predstavljala značajan deo ukupne cene. Sa slike 5.32 se takođe vidi da je solid-state tehnika ekonomičnija od submerzne i sa nižim jediničnim troškovima proizvodnje enzima. Troškovi komunalnih usluga i sirovina koji se koriste u solid-state bioprocesu su znatno niži od onih koji se koriste kod submerznog, što je razlog zašto je solid-state tehnika kultivacije ekonomičnija u poređenju sa submerznom tehnikom izvođenja bioprocesa.



Slika 5.32. Raspodela troškova proizvodnje enzima iz pšenične plevice korišćenjem submerzne i solid-state tehnike kultivacije

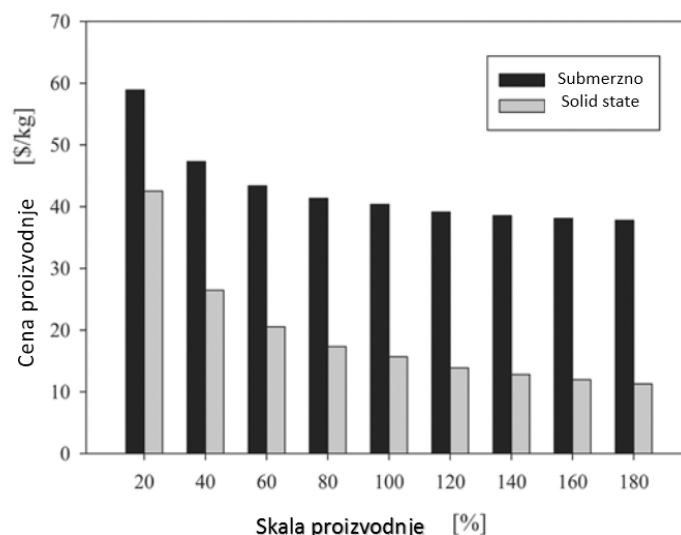
Analiza profitabilnosti. Analiza profitabilnosti je izvedena samo za solid-state bioproces jer se pokazao kao superiorniji u odnosu na submerzni bioproces za proizvodnju enzima na hranljivoj podlozi koja kao osnovu sadrži pšeničnu plevicu. Period otplate je jednostavan pokazatelj koji meri koliko vremena je potrebno da se povрати početno ulaganje u postrojenje za proizvodnju enzima. Prilikom izbora između nekoliko međusobno isključivih projekata, najprihvatljiviji će biti projekat sa najkraćim periodom otplate. Period otplate se obračunava kao količnik ukupne kapitalne investicije i neto dobiti i iznosi 2,75 godine za solid-state postupak. Neto sadašnja vrednost (NPV) ukazuje na očekivani uticaj projekta na vrednost simuliranog postrojenja za proizvodnju enzima. Očekuje se da će projekti sa pozitivnim NPV-om povećati vrednost simuliranog postrojenja za proizvodnju enzima. Prilikom izbora između nekoliko međusobno isključivih projekata, treba izabrati projekat sa najvećim pozitivnim NPV-om. NPV se obračunava kao trenutna vrednost neto promene novca projekta (NCF – Net Cash Flow), godišnje naknade minus troškovi. Neto sadašnja vrednost je izračunata i iznosi 29.895.000 \$ po diskontnoj stopi 7%. Interna stopa povrata (IRR – Internal Rate of Return) nekog projekta kapitalnog budžetiranja, koja je takođe poznata kao diskontna gotovinska stopa prinosa (DCRR – Discounted Cash Rate of Return), izračunava se na osnovu neto promene novca (NCF). Metod izračunavanja IRR-a ograničava neto sadašnju vrednost (NPV) svih neto novčanih tokova na nulu. Pri izboru između nekoliko međusobno isključivih projekata treba odabrati projekat sa najvišim IRR-om. IRR za solid-state proces je izračunat i iznosi 27.93%. Generalno, sve ove vrednosti indikatora profitabilnosti ukazuju na to da je solid-state metoda ekonomski isplativija.

Analiza nesigurnosti. U ovom delu je izvedena analiza nesigurnosti kako bi se utvrdile uticajne ekonomske i tehničke varijable za ekonomsku analizu procesa proizvodnje enzima. Rezultati analize nesigurnosti pružaju veći uvid u ekonomiju proizvodnje enzima koristeći submerznu i solid-state tehniku kultivacije. Analiza je sprovedena sa ciljem da se utvrdi uticaj na jedinične troškove za proizvodnju enzima koristeći submerznu i solid-state tehniku kultivacije od promena u veličini proizvodnje. Uticaji na indikatore profitabilnosti takođe se ispituju za solid-state bioproces.

U osnovnoj ekonomskoj analizi dobijena je veličina šarže (skala) proizvodnje enzima i koristi se kao polazna tačka za varijaciju. Ova analiza procenjuje uticaj $\pm 80\%$ promene ove inicijalne skale proizvodnje (-80%, -60%, -40%, -20%, + 20%, + 40%, + 60% i + 80%) na jedinične troškove za proizvodnju enzima (za submerznu i solid-state tehniku kultivacije) i pokazatelje profitabilnosti za bioproces za proizvodnju enzima (samo za solid-state tehniku kultivacije). Tabela 5.16 prikazuje rezultate ovih analiza nesigurnosti u smislu indikatora profitabilnosti za solid-state bioproces, dok slika 5.33 predstavlja upoređivanje uticaja promena razmera postrojenja na jedinične troškove proizvodnje enzima između submerznog i solid-state bioprocesa.

Tabela 5.16. Analiza osetljivosti za uticaj veličine proizvodnje enzima iz pšenične plevice na profitabilnost korišćenjem solid-state tehnike kultivacije

Promenljive	Indikatori profitabilnosti			
	Period povrata (godina)	Neto sadašnja vrednost (1,000 \$)	Interna stopa povrata (%)	
Veličina proizvodnje (kg/šarži iz glavnog bioreaktora)	-80%	71,19	-14.636.624	N/A
	-60%	5,58	-1.539	4,92
	-40%	3,79	8.736	14,92
	-20%	3,06	20.081	21,64
	Bazno	2,75	30.387	25,39
	+20%	2,36	43.869	30,70
	+40%	2,16	56.023	33,83
	+60%	2,00	68.397	36,64
	+80%	1,81	80.955	39,14



Slika 5.33. Uticaj veličine postrojenja za proizvodnju enzima iz pšenične plevice na jedinične proizvodne troškove za sumerznu i solid-state tehniku kultivacije

Kao što se vidi iz tabele 5.16 i slike 5.33, skala proizvodnje značajno utiče na jedinične troškove za proizvodnju enzima koristeći submerznu i solid-state fermentaciju. Kada se proizvodna skala smanji za 80%, jedinični troškovi za submerzan bioproces se povećavaju za 46% (sa 39,58 \$/kg na 58,90 \$/kg), dok se jedinični troškovi za solid-state bioproces povećavaju za 171% (sa 14,35 \$/kg do 42,51 \$/kg). Kada se proizvodna skala poveća za 80%, jedinični trošak za submerzan bioproces se smanjuje za 6% (od 39,58 \$/kg do 37,77 \$/kg), dok se jedinični trošak za solid-state bioproces smanjuje za 28% (sa 14,35 \$/kg do 11,27 \$/kg).

Takođe, ovi rezultati ukazuju na to da je solid-state tehnika kultivacije ekonomičnija od submerzne bez obzira na promene u proizvodnoj skali. Što se tiče uticaja promena proizvodne skale na profitabilnost za solid-state bioproces, tabela 5.16 pokazuje da za indikator "perioda otplate", sve promene dovode do perioda otplate manje od šest godina što podrazumeva da se investicija može povratiti u kratkom vremenskom periodu. Pored toga, indikator "neto sadašnje vrednosti", za -80% i -60% promene proizvodne skale dovodi do negativnih neto sadašnjih vrednosti, u kom slučaju investicija nije profitabilna. Za indikator "interne stope povraćaja", za -80% promene skale proizvodnje dovodi do neizvodljivog rešenja koje nikada neće biti profitabilno.

6. ZAKLJUČAK

Ovom disertacijom obuhvaćena su i izvršena istraživanja vezana za naše podneblje. Prikazani rezultati mogu se sažeti u nekoliko sledećih tačaka:

- Ispitivanjem sastava sirovine ustanovljeno je da nusproizvod prerade žita, tj. pšenična plevica ima standardan sastav, i to prvenstveno celuloze, hemiceluloze, skroba i lignina (kao najbitnijih parametara za biotehnološku proizvodnju), a potom i pepela i proteina. Na osnovu definisanog sastava ove sirovine, može se zaključiti da ona poseduje potencijal za primenu kao osnove hranljivih podloga sa ciljem proizvodnje hidrolitičkih enzima kultivacijom plesni.
- Mogućnost proizvodnje hidrolitičkih enzima i odabir proizvodnog soja izvedeno je ispitivanjem količine produkovanih proteina, kao i aktivnosti tih hidrolitičkih enzima (amilaze, celulaze, ksilanaze) od strane tri različite vrste plesni (*Trichoderma reesei*, *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp.) nakon njihove kultivacije submerznom i solid-state tehnikom kultivacije na podlozi čije je osnova bila pšenična plevica. Prema svim odabranim pokazateljima (ukupan sadžaj protein i aktivnosti enzima u filtratima kultivacione tečnosti) izdvojio se soj *Trichoderma reesei*, koji je po svim parametrima bio bolji u odnosu u na druga dva ispitivana mikroorganizma, bez obzira na tehniku kultivacije.
- Ispitivanjem toka kultivacije plesni *T. reesei* kroz analizu uzoraka uzetih periodično u toku 7 dana trajanja bioprocasa, sagledane su zavisnosti ukupnog sadržaja proteina, aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza, kao i sadržaja redukujućih šećera od vremena kultivacije i ustanovljeno je da pomenuti sadržaji i aktivnosti variraju sa vremenom, odnosno da postoji značajan uticaj ovo pšrocesnog parametra.

- Analiziranjem uticaja temperature kultivacije (25-35 °C), vrednosti pH (4-6) i vremena kultivacije (3-7 dana) na ukupan sadržaj proteina i aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza nakon kultivacije plesni submerznom tehnikom na podlozi čija osnova je pšenična plevica, ustanovljeno je uz pomoć metode odzivne površine i željene funkcije da se pod kontrolisanim uslovima (maksimalno moguć ukupan sadržaj proteina i najveća aktivnost svih pomeutih enzima) najbolji rezultati mogu očekivati pri temperaturi kultivacije 30,26 °C, vrednosti pH 4,06 i vremenu kultivacije 7,00 dana.
- Ispitivanjem efekata temperature kultivacije (25-35 °C), vrednosti pH (4-6) i vremena kultivacije (3-7 dana) pomoću metode odzivne površine i željene funkcije na krajnju koncentraciju proteina i aktivnost hidrolitičkih enzima nakon kultivacije *Trichoderma reesei* solid-state tehnikom na podlozi od pšenične plevice, zaključeno je da se pod određenim uslovima (maksimalno moguć sadržaj enzima i najveća aktivnost amilaza, celulaza i ksilanaza) dobijaju najbolji rezultati pri temperaturi kultivacije 31,64 °C, vrednosti pH 6,00 i vremenu kultivacije 7,00 dana.
- Ubacivanjem rezultata optimizacije, zajedno sa literarnim podacima o biotehnološkoj proizvodnji enzima, u model bioprocasa proizvodnje enzima iz pšenične plevice definisani su kapaciteti postrojenja za dve različite tehnike kultivacije (submerzno i solid-state) na osnovu podataka o godišnjoj raspoloživosti pšenične plevice u Srbiji. Rezultati simulacije ove dva modela postrojenja za proizvodnju enzima iz pšenične plevice iskorišćeni su za proračun, kapitalnih troškova, troškova jedinične proizvodnje, kao i operativnih troškova. Ekonomskom analizom utvrđeno je da su obe tehnike kultivacije (submerzno i solid-state) ekonomski isplative. Nakon poređenja svih navedenih prethodno ekonomskih parametara i dodatne analize profitabilnosti i nesigurnosti za dva ispitivana modela, ustanovljeno je da je bioprocess sa solid-state tehnikom kultivacije prema svim ekonomskim pokazateljima bolji sa stanovišta investitora.

7. LITERATURA

- Abd-Alla MH, Zohri AA, El-Enany AE, Ali SM (2017): Conversion of food processing wastes to biofuel using clostridia, *Anaerobe*, 48:135-143.
- Anwar Z, Gulfraz M, Irshad M (2014): Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-engry: A brief review, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2): 163-173.
- Asgher M, Ahmed N, Iqbal HMN (2011): Hyperproductivity of extracellular enzymes from indigenous white rot fungi (*P. chrysosporium* IBL-03) by utilizing agro-wastes. *BioResources*, 6(4): 4454-4467.
- Assareh, R, Shahbani Zahiri H, Akbari Noghabi K, Aminzadeh S (2012): Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. TI, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws, *Bioresource technology*, 120: 99-105.
- Bansal N, Tewari R, Soni R, Soni SK (2012): Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues, *Waste Management*, 32: 1341–1346.
- Barrera I, Amezcua-Allieri MA, Estupinan L, Martínez T, Aburto J (2016): Technical and economical evaluation of bioethanolproduction from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagassesIliana, *Chemical Engineering Research and Design*, 107: 91-101.
- Barros FFC, Simiqueli APR, de Andrade CJ, Pastore GM (2013): Production of Enzymes from groindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*, 2013, Article ID 103960, 9 pages.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbialxylanases and their industrial applications: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 326-338.
- Behera BC, Sethi BK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN (2017): Microbial cellulases – Diversity & biotechnologywith reference to mangrove environment: A review, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 197-210.
- Belyea RL, Rausch KD, Tumbleson ME (2004): Composition of corn an distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing, *Bioresource Technology* 94: 293–298.
- Bertoldo C, Antranikian G (2000): Amyolytic enzymes from hyperthermophiles, *Methods in enzymology*, 330: 269-289.
- Bharathiraja S, Suriya J, Krishnan M, Manivasagan P, Kim SK (2017): Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol 80 (Ed. Eskin M). Elsevier Inc.
- Biz A, Finkler ATJ, Pitol LO, Medina BS, Krieger N, Mitchell DA (2016): Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, 111: 54–62.
- Bledzki AK, Mamun AA, Volk J (2010): Physical, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(4): 480-488.

- Blokhin AV, Shishonok MV, Voitkevich OV (2012): Thermodynamic Properties of [C6mim][NTf2] in the Condensed State, *Russian Journal of Applied Chemistry*, 85, 303-308.
- Brijwani K, Oberoi HS, Vadlani PV (2010): Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran, *Process Biochemistry*, 45:120-128.
- Burlacu A, Cornea CP, Israel-Roming F (2016): Microbial xylanase: a review, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 20: 335-342.
- Chapla D, Divecha J, Madamwar D, Shah A (2010): Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification, *Biochemical Engineering Journal*, 49: 361-369.
- Chen H, Liu J, Chang X, Chen D, Xue Y, Liu P, Lin H, Han S (2017): A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals, *Fuel Processing Technology*, 160: 196-206.
- Cizeikiene D, Juodeikiene G, Damasius J (2018): Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15:185-191.
- Collins T, Gerday C, Feller G (2005): Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1): 3-23.
- Crueger W, Crueger A., (1994). *Biotehnologija (udžbenik industrijske mikrobiologije)*, (Interni prevod sa 2 izdanja za studente prof. dr Slobodan Gaćeša), Novi Sad.
- de Castro AM, Carvalho DF, Guimaraes Freire DM, Catislho LR (2010): Economic Analysis of the Production of Amylases and Other Hydrolases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake, *Enzyme Research*: 1-9.
- de Souza Vandenberghe LP, de Carvalho JC, Libardi N, Rodrigues C, Soccol CR (2016): Microbial Enzyme Factories: Current Trends in Production Processes and Commercial Aspects. In: *Agro-industrial Wastes as feedstock for enzyme production* (Eds, Dhillon GS, Kaur S). Elsevier Inc.
- de Vries RP, Visser J (2001): *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4): 497-522.
- Delabona PS, Pirota R, Codima CA, Tremacoldi CR, Rodrigues A, Farinas CS (2013): Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization, *Industrial Crops and Products*, 42: 236- 242.
- Díaz AB, Alvarado O, de Ory I, Caro I, Blandino A (2013): Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice, *Food and bioproducts processing*, 91: 580-586.
- Dodić J, Grahovac J (2013): *Industrijska mikrobiologija praktikum*, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Duguid KB, Montross MD, Radtke CW, Crofcheck CL, Shearer SA, Hoskinson RL (2007): Screening for sugar and ethanol processing characteristics from anatomical fractions of wheat stover, *Biomass and Bioenergy*, 31: 585-592.

- Đukić D, Jemcev V (2004). Opšta i industrijska mikrobiologija, Stylos, Novi Sad.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M (2008): Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11): 1531-1538.
- Fang H, Xia L (2014): Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues, *Fuel*, 143: 211-216.
- Farinas C, Vitcosque G, Fonseca R, Neto V, Couri S (2011): Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor, *Industrial Crops and Products*, 34:1186–1192.
- Ferreira NL, Margeot A, Blanquet S, Berrin J (2014): Use of cellulose from *Trichoderma reesei* in the twenty first century—Part 1: current industrial uses and future applications in the production of second generation ethanol, In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 245-261.
- Fleißner A, Dersch P (2010): Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 1255-1270.
- Gao J, Weng H, Zhu D, Yuan M, Guan F, Xi Y (2008): Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover, *Bioresource Technology*, 99:7623–7629.
- Gusakov AV, Sinitsyn AP (2012): Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass, *Biofuels*, 3(4): 463-477.
- Hamlyn PF, Wales DS, Sagar BF (1987): Extracellular Enzymes of *Penicillium*. In: (eds, Peberdy JF) *Penicillium and Acremonium*. *Biotechnology Handbooks*, vol 1. Springer, Boston, MA.
- Hansen G, Lubeck M, Frisvad J, Lubeck P, Andersen B (2015): Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation, *Process Biochemistry*, 50, 1327-1341.
- Harrison RG, Todd PW, Rudge SR, Petrides DP (2015): *Bioseparations science and engineering*, Oxford University Press.
- Heinzelman PC, Snow D, Wul, Nguyen C, Villalobos A, Govindarajan S, Minshull J, Arnold FH (2009): A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (14): 5610-5615:
- Heinzle E, Biewer A, Cooney, C (2006): *Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Hirasawa H, Shioya K, Mori K, Tashiro K, Aburatani S, Shida Y, Kuhara S, Ogasawara W (2019): Cellulase productivity of *Trichoderma reesei* mutants developed in Japan varies with varying pH conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, In Press, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.005>.
- Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S (2003): Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production, *African Journal of Biotechnology*, 2(12): 602-619.

- Hu Y, Du C, Pensupa N, Lin CSK (2018), Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design, *Process Safety and Environmental Protection*, 118: 133-142.
- Iqbal HMN, Ahmed I, Zia MA, Irfan M (2011): Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2: 149-156.
- Irshad M, Anwar Z, But H I, Afroz A, Ikram N, Rashid U (2013): The industrial applicability of purified cellulose complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes, *BioResources*, 8(1): 145-157.
- Irshad M, Anwar Z, Ramzan M, Mahmood Z, Nawaz H (2013): Characterization of purified β -glucosidase produced from *Trichoderma viride* through bio-processing of orange peel waste, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 941-944.
- Isikgor FH, Becer CR (2015): Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers, *Polymer chemistry*, 6: 4497–4559.
- Jecu L (2000): Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production, *Industrial Crops and Products*, 11:1–5.
- Ji N, Liu C, Li M, Sun Q, Xiong L (2018): Interaction of cellulose nanocrystals and amylase: Its influence on enzyme activity and resistant starch content, *Food Chemistry*, 245, 481-487.
- Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C (2007): Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1:119-134.
- Jovanović M, Vučurović D, Bajić B, Dodić S, Vlajkov V, Jevtić-Mučibabić R (2019): Optimization of simultaneous cellulase and xylanase production by submerged and solid-state fermentation of wheat chaff, *Journal of the Serbian Chemical Society*, <https://doi.org/10.2298/JSC190530080J>.
- Jourdier E, Poughon L, Larroche C, Monot F, Chaabane FB (2012): A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains: application to cellulase hyper-producing *Trichoderma reesei* strains, *Microbial Cell Factories* 11, 70.
- Juturu V, Wu JC (2014): Microbial cellulases: Engineering, production and applications, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33: 188–203.
- Kaur PS, Kaur S, Kaur H, Sharma A, Raj P, Panwar S (2015): Solid Substrate Fermentation using Agro Industrial Waste: New Approach for Amylase Production by *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12): 712-717.
- Knežević-Jugović Z (2008): Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko metalurški fakultet Beograd.
- Kosanović D (2015): Vrste roda *Trichoderma*, uzročnici zelene plesni šampinjona [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] i njihova osetljivost na fungicide i biofungicide, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

- Kuhad RC, Deswal D, Sharma S, Bhattacharya A, Jain KK, Kaur A, Pletschke BI, Singh A, Karp M (2016): Revisiting cellulose production and redefining current strategies based on major challenges, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55: 249–272.
- Kumar P, Yadava RK, Gollen B, Kumar S, Verma RK, Yadav S (2011): Nutritional Contents and Medicinal Properties of Wheat: A Review, *Life Sciences and Medicine Research*, 2011: LSMR-22
- Kumar R, Singh S, Singh OV (2008): Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 377-391.
- Kwan TH, Hu Y, Lin CSK (2018): Techno-economic analysis of a food waste valorisation process for lactic acid, lactide and poly(lactic acid) production, *Journal of Cleaner Production*, 181: 72-87.
- Kwiatkowski JR, McAloon AJ, Taylor F, Johnston, DB (2006) Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process, *Industrial Crops and Products* 23: 288–296.
- Lam KF, Leung CCJ, Lei HM, Lin CSK (2014): Economic feasibility of a pilot-scale fermentative succinic acid production from bakery wastes, *Food and Bioprocess Processing*, 92: 282-290.
- Latifian M, Hamidi-Esfahani Z, Barzegar M (2007): Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions, *Bioresource Technology*, 98: 3634–3637.
- Liu X, Kokare C (2017): Microbial Enzymes of Use in Industry, In: *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (ed. Brahmachari G, Demain AL, Adrio JL), Academic Press, UK.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 190, 265-275.
- Lubertozzi D, Keasling JD (2009): Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression, *Biotechnology Advances*, 27: 53-75.
- Mahalaxmi Y, Sathish T, Subba Rao Ch, Prakasham RS (2010): Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated *Amycolatopsis* sp. RSP 3 under SSF, *Process Biochemistry*, 45: 47-53.
- Malherbe S, Cloete TE (2002): Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications, *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 1: 105–114.
- Mamma D, Kourtoglou E, Christakopoulos P (2008): Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry, *Bioresource Technology*, 99: 2373-2383.
- Mamun A, Al Bledzki AK (2014): Enzyme modification of grain by-products and their biocomposites: characterization, mechanical and thermal properties characterization, *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(2): 248-256.
- Mann ME, Cohen RDH, Kernan JA, Nicholson HH, Christensen DA, Smart ME (1988): The Feeding value of ammoniated flax straw, wheat star and wheat chaff for beef cattle, *Animal Feed Science and Technology*, 21(1): 57-66.

- Marić V, Šantek B (2009): Biokemijsko inženjerstvo, Golden marketing –Tehnička knjiga, Zagreb.
- McCartney D H, Block HC, Dubeski PL, Ohama AJ (2006): Review: The composition and availability of straw and chaff from small grain cereals for beef cattle in western Canada, *Canadian Journal of Animal Science*, 86 (4): 443-455.
- McCartney DH, Block HC, Dubeski PL, Ohama AJ (2006): Review: The composition and availability of straw and chaff from small grain cereals for beef cattle in western Canada. *Canadian Journal of Animal Science*, 86(4): 443-455.
- Mel M, Yong ASH, Avicenna, Ihsan SI, Setyobudi RH (2015): Simulation Study for Economic Analysis of Biogas Production from Agricultural Biomass, *Energy Procedia*, 65: 204-214.
- Meyer V, Wu B, Ram AFJ (2011): *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives, *Biotechnology Letters*, 33: 469-476.
- Mihajlovski KR (2016): Poljoprivredni i industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Miller GL, (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Motta FL, Andrade CCP, Santana MHA (2013) A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: sustainable degradation of lignocellulosic biomass -techniques, applications and commercialization (ed Chandel A, Silva SS), InTechOpen.
- Mores WD, Knutsen JS, Davis RH (2001): Cellulase recovery via membrane filtration, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93: 297-309.
- Mupondwa E, Li X, Tabil L (2018): Integrated bioethanol production from triticale grain and lignocellulosic straw in Western Canada, *Industrial Crops & Products*, 117: 75-87.
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012): Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes, In: *Industrial Waste*, InTech, Shanghai, China, pp. 121-140.
- Nghiem NP, Ramirez EC, McAloon AJ, Yee W, Johnston DB, Hicks KB (2011): Economic analysis of fuel ethanol production from winter hulled barley by the EDGE (Enhanced Dry Grind Enzymatic) process, *Bioresource Technology* 102: 6696–6701.
- NREL/TP-510-42618 (2010): Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, National Renewable Energy Laboratory, Washington, USA.
- NREL/TP-510-42621 (2008): Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples, National Renewable Energy Laboratory, Washington, USA.
- NREL/TP-510-42622 (2008): Determination of Ash in Biomass, National Renewable Energy Laboratory, Washington, USA.
- NREL/TP-510-42625 (2008): Determination of Protein Content in Biomass, National Renewable Energy Laboratory, Washington, USA.

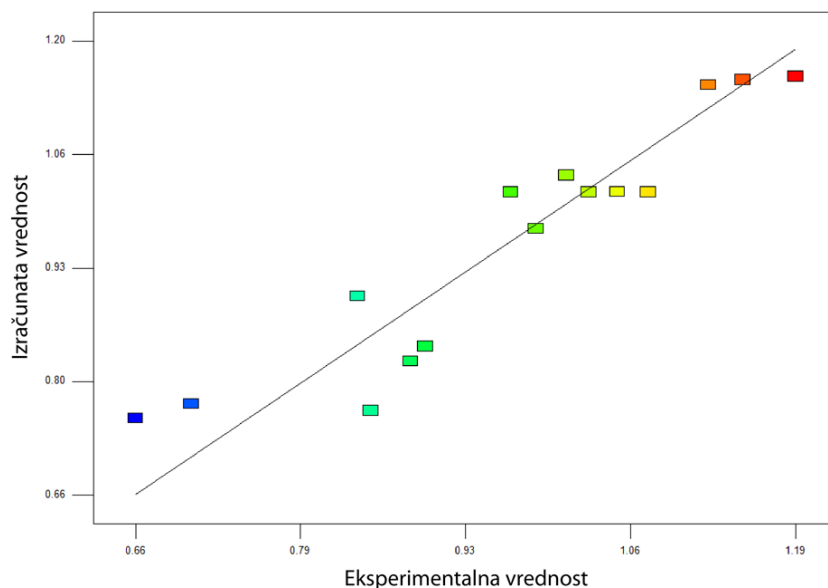
- NREL/TP-510-48087 (2010): Summative Mass Closure, National Renewable Energy Laboratory, Washington, USA.
- Oberoi HS, Chavan Y, Bansal S, Dhillon GS (2010): Production of Cellulases through Solid State Fermentation Using Kinnow Pulp as a Major Substrate. *Food and Bioprocess Technology*, 3: 528–536.
- Ohara A, Santos JG, Angelotti JAF, Barbosa PPM, Dias FFG, Bagagli MP, Sato HH, Castro RJS (2018): A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation, *Food Science and Technology*, 1-7.
- Pan S, Chen G, Zeng J, Cao X, Zheng X, Zeng W, Liang Z (2019): Fibrinolytic enzyme production from low-cost substrates by marine *Bacillus subtilis*: Process optimization and kinetic modeling, *Biochemical Engineering Journal*, 141, 268-277.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000): New Developments in Solid State Fermentation: I- Bioprocesses and Products, *Process Biochemistry*, 35 (10): 1153- 1169.
- Papinutti VL, Forchiassin F (2007): Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation, *Journal of Food Engineering*, 81: 54-59.
- Pastornjicki Goran (2011): Proizvodnja celulaže iz *Neurospora crassa* na pšeničnoj plevi, Diplomski rad, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Patel AK, Singhanian RR, Pandey A (2017): Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, In: *Biotechnology of Microbial Enzymes* (ed. Brahmachari G), Elsevier Inc. pp 13-41.
- Patel VR (2017): Cost-effective sequential biogas and bioethanol production from the cotton stem waste, *Process Safety and Environmental Protection*, 111: 335-345.
- Pejin D (2003): *Industrijska mikrobiologija*, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Perez J, Munoz-Dorado J, de la Rubia T, Martinez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *International Microbiology*, 5(2): 53-63.
- Peterson R, Nevalainen H (2012): *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement, *Microbiology*, 158: 58-68.
- Piletić MV, Milić BLj (1989): *Organska hemija III deo*, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Pirota RDPB, Tonelotto M, Delabona PS, Fonseca RF, Paixao DAA, Baleeiro FCF, Neto VB, Farinas CS (2013): Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions, *Industrial Crops and Products*, 45: 465-471.
- Pitol LO, Biz A, Mallmann E, Krieger N, Mitchell DA (2016): Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor, *Chemical Engineering Journal*, 283: 1009–1018.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, MontiR, Terenzi HF, Jorge JA, AmorimDS (2005): Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577–591.

- Ray RC, Behera SS (2017): Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases, In: *Biotechnology of Microbial Enzymes* (ed. Brahmachari G), Elsevier Inc. pp 43-80.
- Reddy GV, Ravindra Babu P, Komaraiah P, Roy KRRM, Kothari I L (2003): Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*), *Process Biochemistry*, 38(10): 1457-1462.
- Rodriguez LA, Toro ME, Vazquez F, Correa-Daneri ML, Gouiric SC, Vallejo MD (2000): Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11): 5914-5917.
- Ruocco M, Lanzuise S, Vinale F, Marra R, Turra D, Woo SL, Lorito M (2009): Identification of a New Biocontrol Gene in *Trichoderma atroviride*: The Role of an ABC Transporter Membrane Pump in the Interaction with Different Plant-Pathogenic Fungi, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3): 291-301.
- Sabarez H, Oliver CM, Mawson R, Dumsday G, Singh T, Bitto N, Mc Sweeney C, Augustin MA (2014): Synergism between ultrasonic pretreatment and white rot fungal enzymes on biodegradation of wheat chaff, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21: 2084–2091
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018): Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review, *Bioresources and Bioprocessing*, 5:1.
- Salak F, Daneshvar S, Abedi J, Furukawa K (2013): Adding value to onion (*Allium cepa* L.) waste by subcritical water treatment, *Fuel Processing Technology*, 112: 86-92.
- Sanchez C (2009): Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi, *Biotechnology Advances*, 27(2):185–194.
- Saranraj P, Stella D, Reetha D (2012): Microbial cellulases and its applications: a review, *International Journal of Biochemistry & Biotech Science*, 1: 1-12.
- Saxena R, Singh R (2011): Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4): 1334–1342.
- Semenčenko VV, Mojović LjV, Petrović SD, Očić OJ (2011): Novi trendovi u proizvodnji bioetanol, *Hemijska industrija*, 65(2): 103-114.
- Singh R, Kapoor V, Kumar V (2012): Utilization of Agro-industrial Wastes for the Simultaneous Production of Amylase and Xylanase by Thermophilic Actinomycetes, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43: 1545- 1552.
- Singhania RR, Patel AK, Pandey A (2010). *The Industrial Production of Enzymes*, In: *Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success* (ed Soetaert W, Vandamme EJ), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Singhania RR, Patel AK, Pandey A (2017): *Biotechnology for Agricultural Waste Recycling*, In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management*, Elsevier B.V.
- Singhania RR, Saini JK, Saini R, Adsul M, Mathur A, Gupta R, Tuli DK (2014): Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases, *Bioresource Technology*, 169: 490–495.

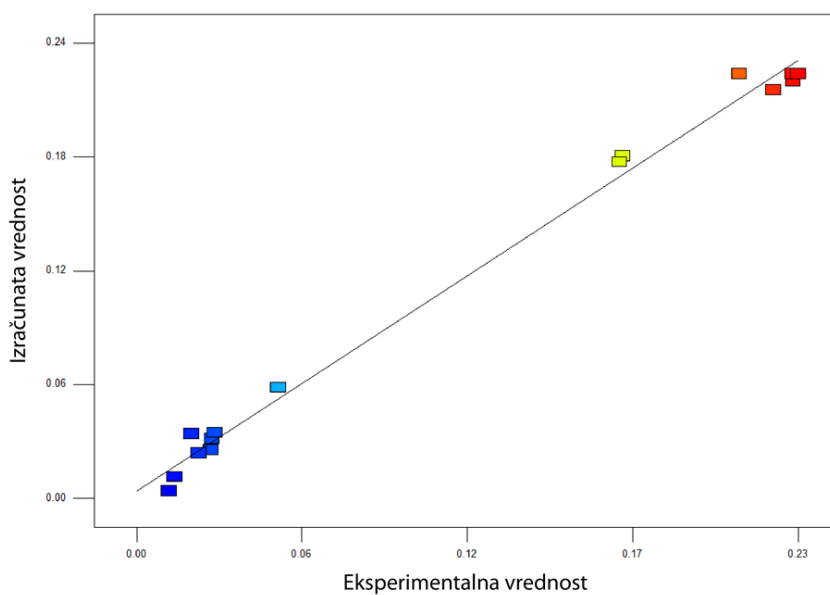
- Singhania RR, Sukumaran RK, Pandey A (2007): Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142: 60–70.
- Smith JE (2009): *Biotechnology*, 5th edition, Cambridge University Press, UK.
- Sokolowski JA, Banks CM (2009): *Principles of Modeling and Simulation A Multidisciplinary Approach*, John Wiley & Sons Ltd.
- Stanbury P, Whitaker A, Hall S (2016): Instrumentation and control, in: F. Geraghty (Ed.), *Principles of Fermentation Technology*, 3rd edn, Butterworth-Heinemann, Amsterdam, 487–536.
- Stoilova I, Krastanov A, Stanchev V (2010): Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1: 208-215.
- Stojanović ŽP, Jeremić KB, Jovanović SM (2011): Uticaj porekla skroba na reološka svojstva koncentrovanih rastvora skroba u vodi, *Hemijska industrija*, 65(6): 645-655.
- Sud D, Mahajan G, Kaur M (2008): Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – a review, *Bioresource Technology*, 99: 6017-6027.
- Szakacs G, Tengerdy RP, Nagy V (2006): Cellulase, In: *Enzyme technology* (eds. Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C), Springer Science, Business Media, Inc. i Asiatech Publishers, Inc., New Delhi.
- Tester RF, Karkalas J, Qi X (2004): Starch—composition, fine structure and architecture, *Journal of Cereal Science*, 39: 151-165.
- Vaishnav N, Singh A, Adsul M, Dixit P, Sandhu SK, Mathur A, Puri SK, Singhania RR (2018): *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production, *Bioresource Technology Reports*, 2: 131-140.
- Van Der Maarel MJ, Van Der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002): Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.
- Vandenbergh LPS, Soccol CR, Pandey A, Lebeault JM (2000): Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*, *Bioresource Technology*, 74: 175-178.
- Vidhyalakshmi R, Vallinachiyar C, Radhika R (2012): Production of Xanthan from Agro-Industrial Waste, *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(2): 56-59.
- Vo TTQ, Wall DM, Ring D, Rajendran K, Murphy JD (2018): Techno-economic analysis of biogas upgrading via amine scrubber, carbon capture and ex-situ methanation, *Applied Energy*, 212: 1191–1202.
- Voitkevich OV, Kabo GJ, Blokhin AV, Paulechka YU, Shishonok V (2012): Thermodynamic Properties of Plant Biomass Components. Heat Capacity, Combustion Energy, and Gasification Equilibria of Lignin, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57, 1903-1909.
- Vučurović D, Dodić S, Popov S (2012) *Projektovanje bioprocasa – zbirka zadataka*. Tehnološki fakultet Novi Sad.

- Vučurović, D (2015): Model bioprocesa proizvodnje etanola iz među- i nus proizvoda prerade šećerne repe, doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Walia A, Guleria S, Mehta P, Chauhan A, Parkash J (2017): Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review, *3Biotech*, 7-11.
- Wang M, Zhou D, Wang Y, Wei S, Yang W, Kuang M, Ma L, Fang D, Xu S, Du S (2016): Bioethanol production from cotton stalk: A comparative study of various pretreatments, *Fuel*, 184:527–532.
- Wyman V, Henríquez J, Palma C, Carvajal A (2018): Lignocellulosic waste valorisation strategy through enzyme and biogas production, *Bioresource Technology*, 247: 402-411.
- Yoo YJ, Feng Y, Kim YH, Yagonia CFJ (2017): *Fundamentals of Enzyme Engineering*, Springer Science-Business Media BV.
- Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology advances*, 24(5): 452-481.

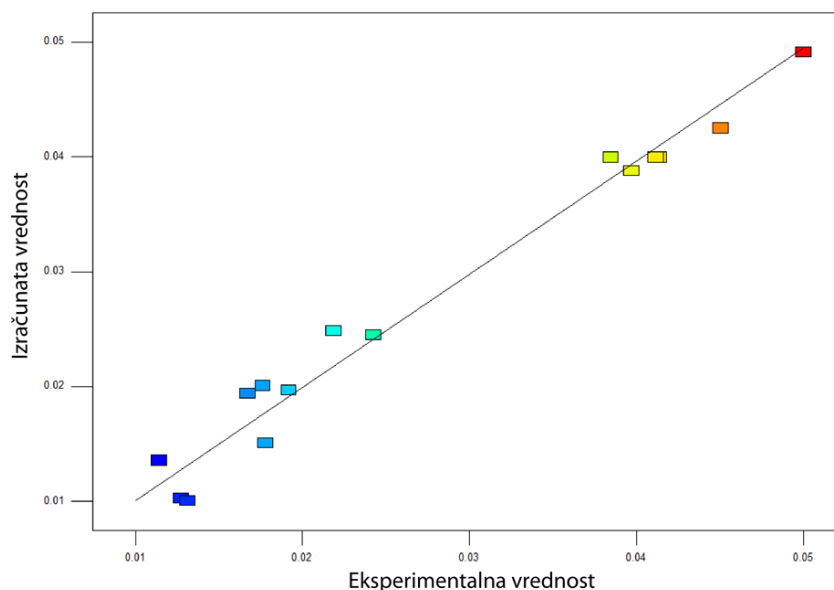
8. PRILOG



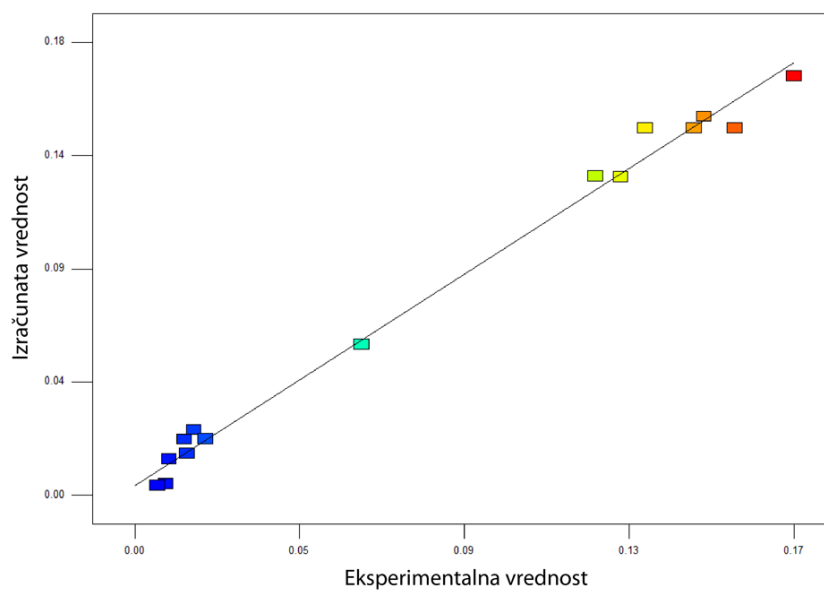
Slika 8.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



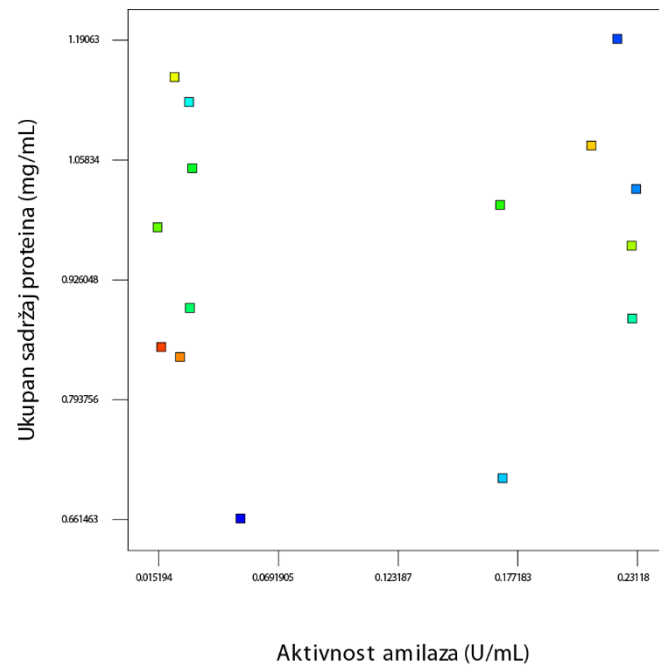
Slika 8.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti aktivnosti amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



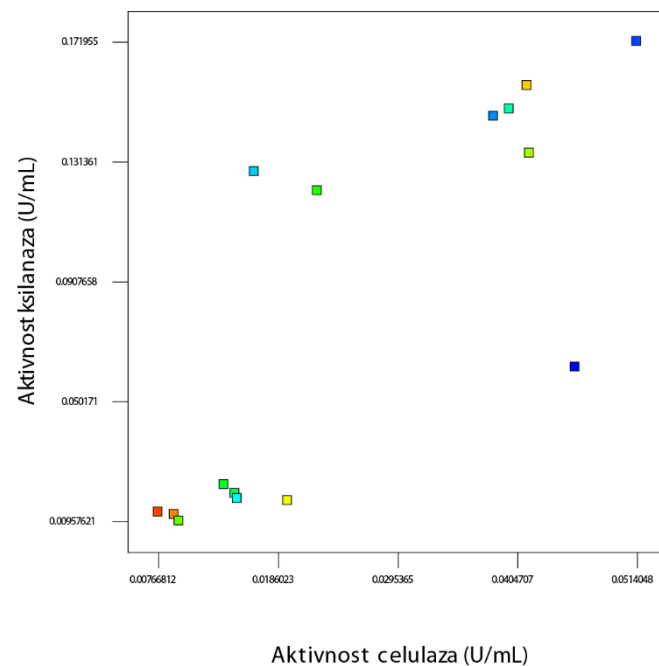
Slika 8.3. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti aktivnosti celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



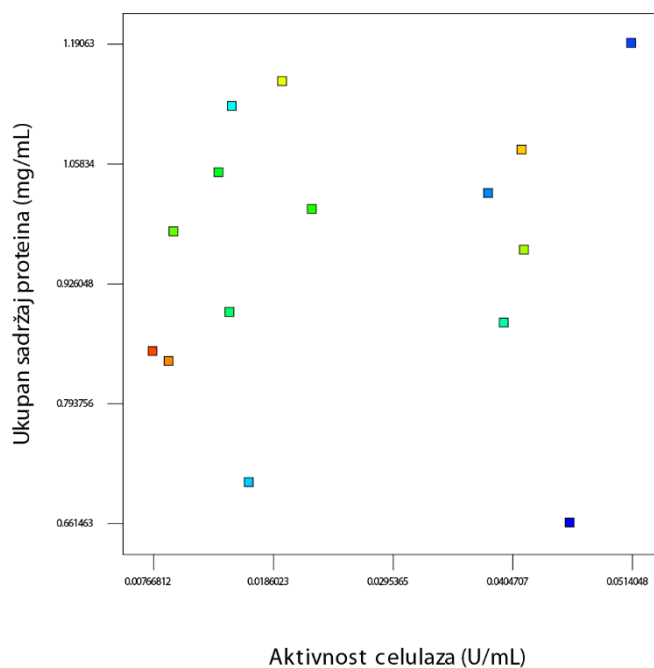
Slika 8.4. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti aktivnosti ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



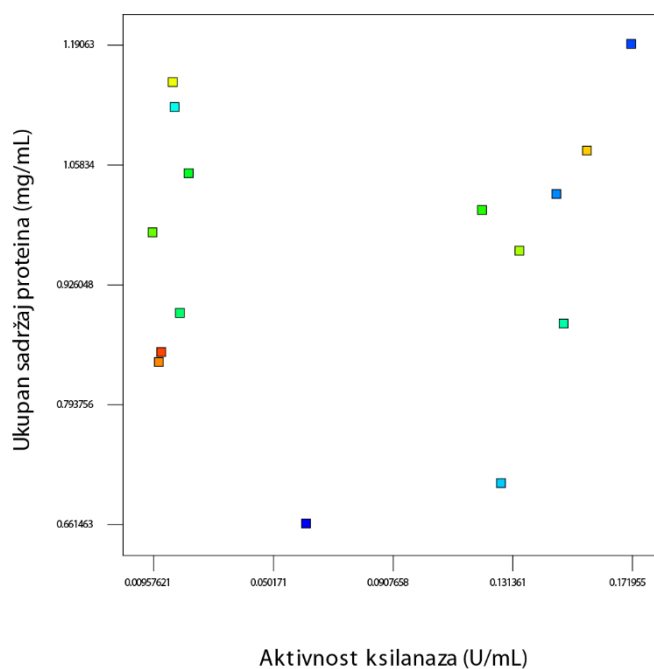
Slika 8.7. Korelacija odziva aktivnosti amilaza i ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



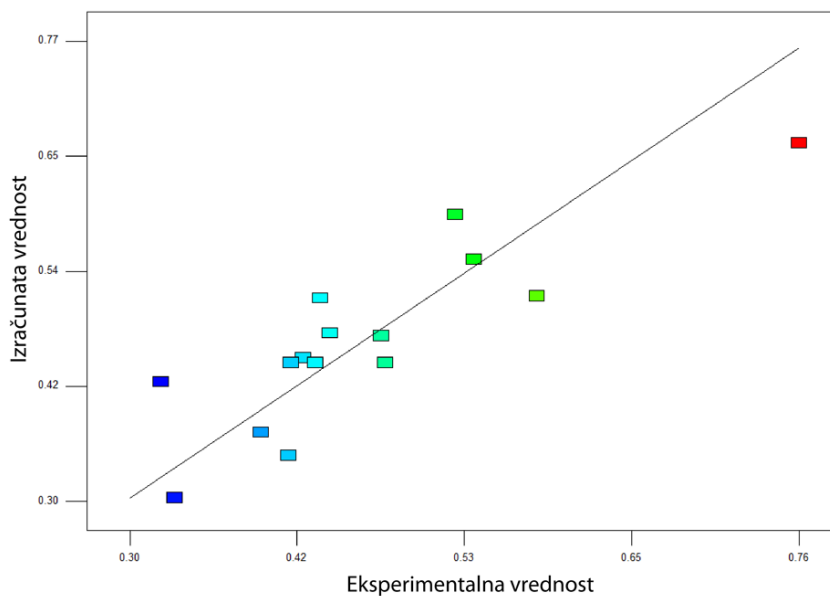
Slika 8.8. Korelacija odziva aktivnosti celulaza i ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



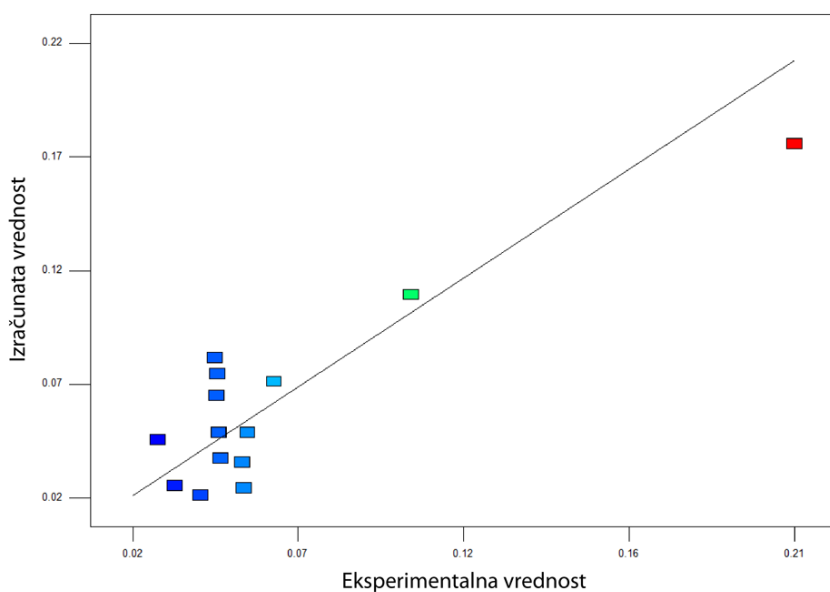
Slika 8.9. Korelacija odziva aktivnosti celulaza i ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



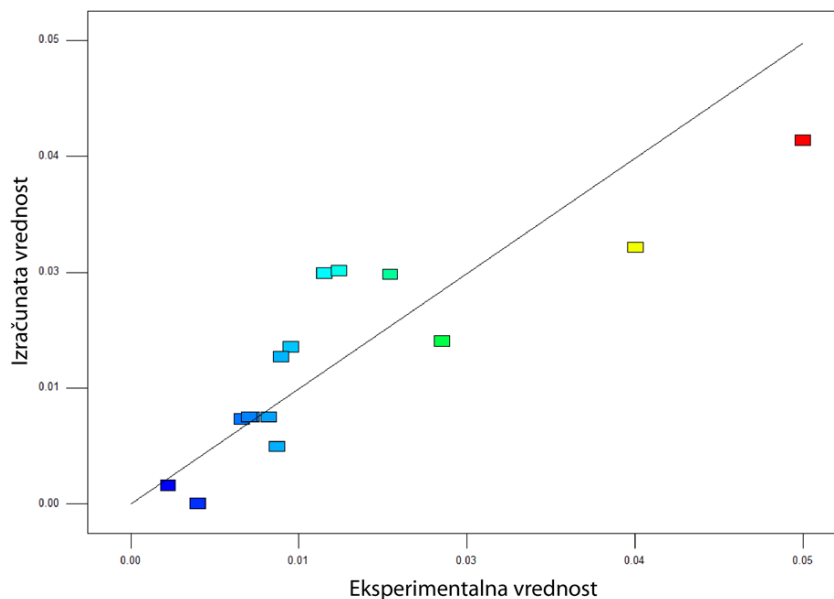
Slika 8.10. Korelacija odziva aktivnosti ksilanaza i ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima submerznom tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



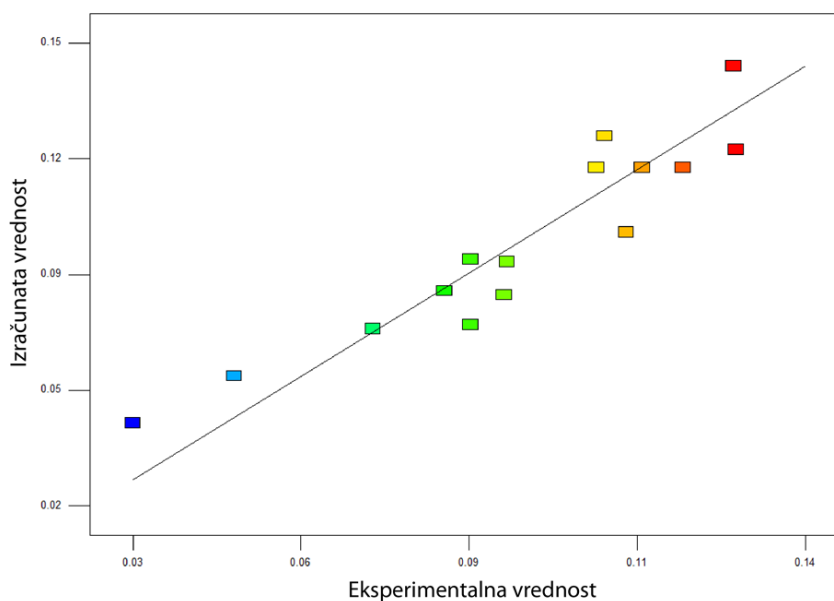
Slika 8.11. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



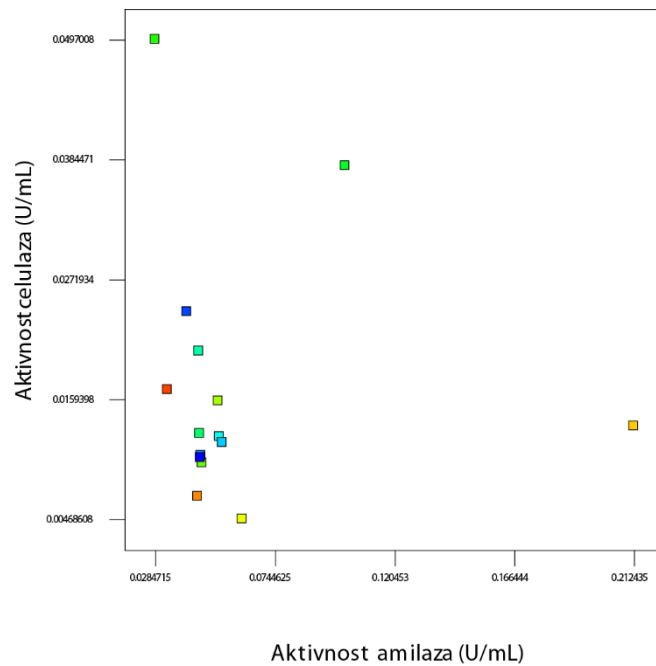
Slika 8.12. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti aktivnosti amilaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



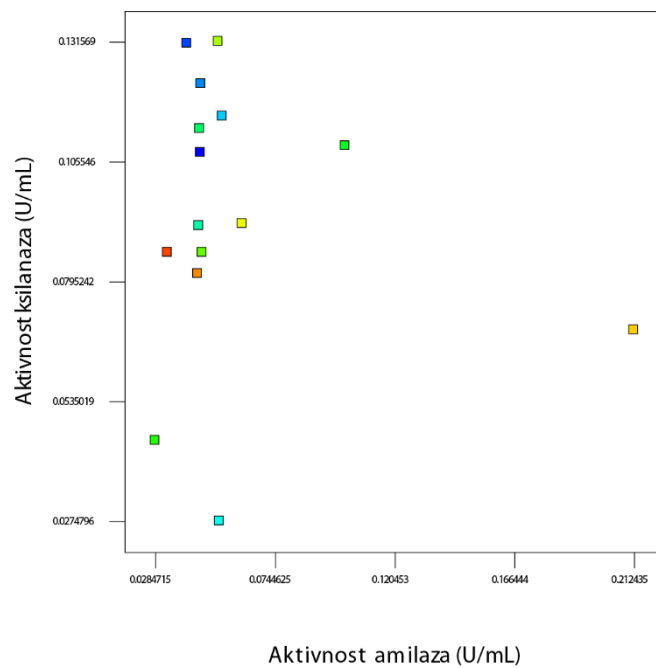
Slika 8.13. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti aktivnosti celulaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



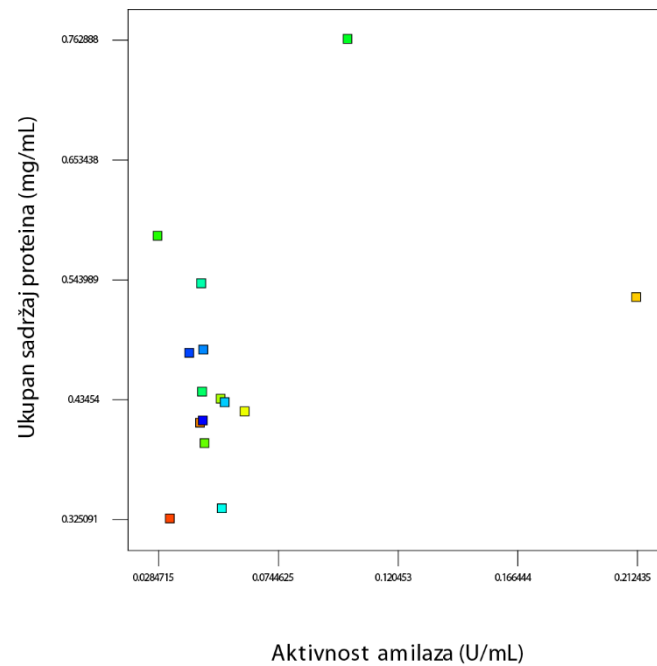
Slika 8.14. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti aktivnosti ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice i vrednosti predviđenih modelom



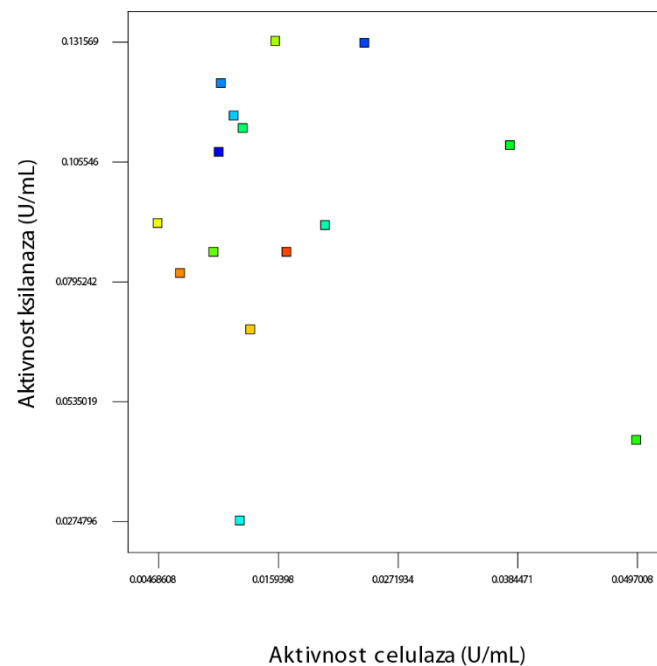
Slika 8.15. Korelacija odziva aktivnosti amilaza i celuloza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



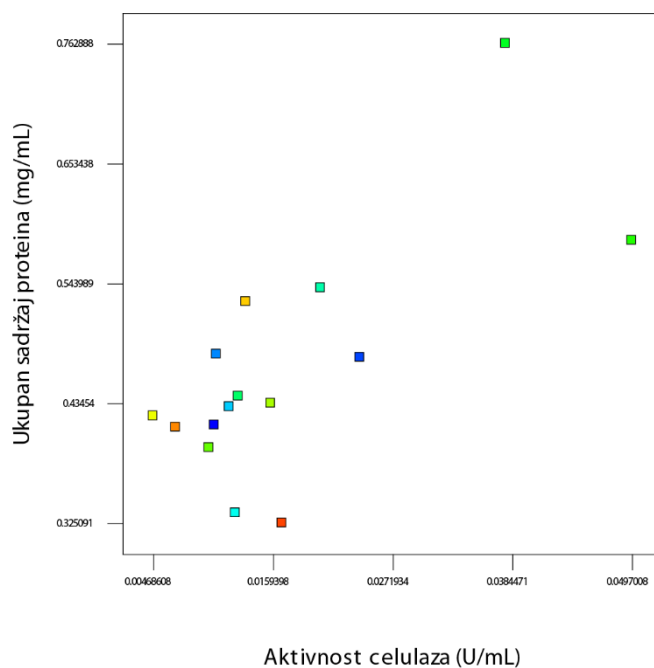
Slika 8.16. Korelacija odziva aktivnosti amilaza i ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



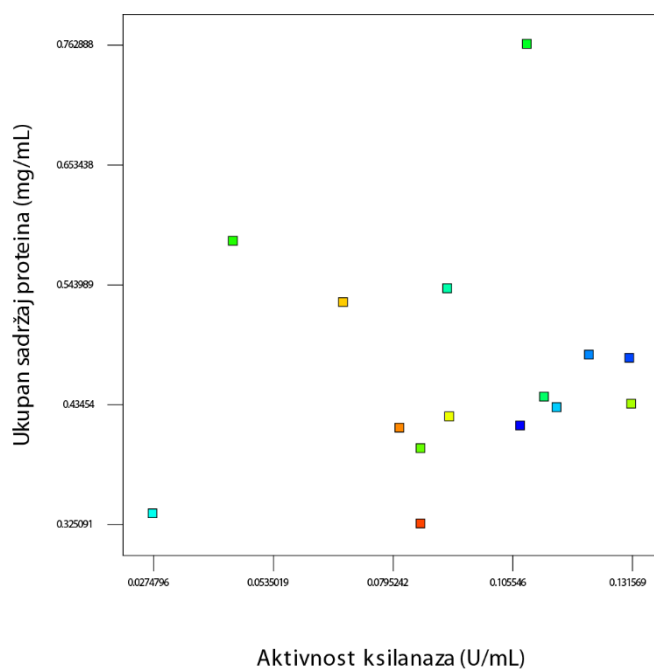
Slika 8.17. Korelacija odziva aktivnosti amilaza i ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



Slika 8.18. Korelacija odziva aktivnosti celulaza i ksilanaza nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



Slika 8.19. Korelacija odziva aktivnosti celulaza i ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice



Slika 8.20. Korelacija odziva aktivnosti ksilanaza i ukupnog sadržaja proteina nakon proizvodnje hidrolitičkih enzima solid-state tehnikom kultivacije iz pšenične plevice

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mirjana Jovanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Damjan Vučurović, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	Model bioprocesa proizvodnje enzima iz nusproizvoda prerade žita
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 8; stranica 123; tabela 21; slika 62; jednačina 2; literaturnih navoda 142
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Biotehnologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Modelovanje, simulacija, enzim, otpad, pšenična plevica
UDK	66.01/.02:[577.15:664.6/.7 (043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija
Važna napomena: VN	nema

<p>Izvod: IZ</p>	<p>Svojim sastavom plevica predstavlja veoma atraktivnu sirovinu za proizvodnju enzima. Sa druge strane, dosadašnja upotreba ovog nusproizvoda prerade žita je bila samo kao hrana za stoku. Stoga se postavlja pitanje mogućnosti dobijanja veće ekonomske i ekološke dobiti primenom date sirovine za proizvodnju nekog visoko vrednog proizvoda, kao što su enzimi, uz valorizaciju ostalih izlaznih tokova procesa sa ciljem postizanja koncepta čistije proizvodnje, odnosno koncepta nulte emisije. Upravo simulacioni modeli postrojenja predstavljaju pomoćnu alatku za izvođenje ekonomske analize i drugih proračuna vezanih za bioproces, a bitnih za projektovanje. Za potrebe generisanja ovakvih modela, a kasnije i kontrolu samog bioprocesa, nužno je poznavati matematičke modele i njihove parametre vezane za dati proces. Utvrđivanje ovih matematičkih jednačina ima smisla samo kada se bioproces izvodi pod optimalnim uslovima. Da bi se proces optimizovao neophodno je detaljno proučavanje proizvodnje enzima kultivacijom nusproizvoda prerade žita pri različitim procesnim parametrima.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>29.03.2018. godine</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO</p>	<p>predsednik: dr Bojana Bajić, docent, Biotehnologija, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Damjan Vučurović, docent, Biotehnologija, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Vesna Vučurović, vanredni profesor, Biotehnologija, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Vladimir Puškaš, vanredni profesor, Biotehnologija, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Rada Jevtić-Mučibabić, viši naučni saradnik, Prehrambeno inženjerstvo, Institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu</p>

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Mirjana Jovanović
Mentor: MN	Damjan Vučurović, assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad
Title: TI	Bioprocess model of enzyme production from wheat processing byproducts
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	Chapters 8; pages 123; tables 21; figures 62; equations 2; refernces 142
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Biotehnology
Subject, Key words SKW	Modeling, simulation, enzyme, waste, wheat chaff
UC	66.01/.02:[577.15:664.6/.7 (043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia
Note: N	none

<p>Abstract: AB</p>	<p>With its composition wheat chaff represents a very attractive raw material for the production of enzymes. On the other hand, the previous use of this by-product of wheat processing was just like cattle food. Therefore, the question arises of the possibility of obtaining greater economic and environmental profit by using the raw material for the production of high-value products, such as enzymes, with the valorization of other process outputs in order to achieve the cleaner production concept, i.e. the zero-emission concept. Simulation models of the plant are an auxiliary tool for conducting economic analysis and other bioprocessing budgets, which are important for designing. For the purposes of generating such models, and later controlling the bioprocess itself, it is necessary to know the mathematical models and their parameters related to the given process. Determining these mathematical equations makes sense only when the bioprocess is performed under optimal conditions. In order to optimize the process it is necessary to study the enzyme production in detail by cultivating by-products of grain processing in different process parameters.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>29th March 2018</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: PhD Bojana Bajić, Assisant Professor, Biotechnology, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: PhD Damjan Vučurović, Assistant Professor, Biotechnology, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: PhD Vesna Vučurović, Associate Professor, Biotechnology, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: PhD Vladimir Puškaš, Associate Professor, Biotechnology, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: PhD Rada Jevtić-Mučibabić, Senior Research Associate, Food Engineering, Institute of Food Technology in Novi Sad</p>