

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

кандидата Иде Е. Заховић, маг. инж. технологије

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ		
1. Датум и орган који је именовано комисију: 17.9.2021. године, Наставно-научно веће Технолошког факултета Нови Сад		
2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> :		
1. <u>Др Јелена Додић</u> име и презиме	<u>Редовни професор</u> звање	<u>Биотехнологија, 15.10.2017.</u> ужа научна област и датум избора
<u>Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду</u> установа у којој је запослен-а		<u>Председник</u> функција у комисији
2. <u>Др Зорана Тривуновић</u> име и презиме	<u>Доцент</u> звање	<u>Биотехнологија, 1.10.2017.</u> ужа научна област и датум избора
<u>Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду</u> установа у којој је запослена		<u>Члан (ментор)</u> функција у комисији
3. <u>Др Бојана Даниловић</u> име и презиме	<u>Ванредни професор</u> звање	<u>Прехрамбене технологије и биотехнологија, 14.11.2018.</u> ужа научна област и датум избора
<u>Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу</u> установа у којој је запослена		<u>Члан</u> функција у комисији
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ		
1. Име, име једног родитеља, презиме: Ида, Есад, Заховић		
2. Датум рођења, општина, држава: 18.7.1991. године, Сјеница, Србија		
3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив: Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду Магистар академске студије, магистар инжењер технологије		
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2015. година, Биотехнологија		
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ		
Оптимизација производње ксантана на сировом глицеролу применом локалног изолата <i>Xanthomonas</i> sp.		
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ		
Докторска дисертација је написана на српском језику, латиничким писмом, на 209 страна А4 формата, са 67 слика, 73 табеле и 167 литературних навода.		

Основни текст дисертације подељен је у 8 поглавља на следећи начин:

1. Увод (стр. 1-2)
2. Циљеви истраживања (стр. 3)
3. Преглед литературе (стр. 4-31, 5 слика и 4 табеле)
4. Материјал и методе (стр. 32-46, 2 слике и 6 табела)
5. Резултати и дискусија (стр. 47-183, 52 слике и 45 табела)
6. Закључци (стр. 184-186)
7. Литература (стр. 187-197)
8. Прилози (стр. 198-209, 8 слика и 18 табела).

Дисертацију чине и садржај, спискови слика, табела и ознака, симбола и скраћеница, кључна документацијска информација са сажетком на српском и енглеском језику, као и план третмана података.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У првом поглављу, односно **Уводу** докторске дисертације експлицитно је указано на значај и актуелност проблематике којом се она бави. Истакнуто је да је потражња за обновљивим изворима енергије, па тако и биогоривима све већа, што за последицу има интензивирање њихове индустријске производње, а самим тим и генерисање значајнијих количина ефлуената. Наведено је да је међу биогоривима посебно популаран биодизел, те да је сирови глицерол најзначајнији нуспроизвод технологије његовог добијања. Будући да је одлагање непречишћеног сировог глицерола у животну средину еколошки неприхватљиво, указано је на велику потребу за проналаском одговарајућег начина за његову одрживу валоризацију. Као решење предложено је да се поменути ефлуент индустрије биодизела искористи као сировина у биотехнолошкој производњи ксантана, комерцијално најзначајнијег биополимера микробиолошког порекла. Дат је кратак опис производног поступка при чему је наглашен значај супституције најчешће коришћених извора угљеника у медијуму за биосинтезу ксантана алтернативним сировинама. Посебно је акцентовано да је за сваку нову сировину потребно пронаћи адекватан производи микрорганizam што је уједно и први корак развоја сваког биотехнолошког поступка производње. На крају поглавља је констатовано да би производња биополимера широке употребне и велике тржишне вредности, какав је ксантан, на медијуму са сировим глицеролом, применом до сада некоришћеног производног соја, била у складу са основним принципима одрживог развоја и да би потенцијално допринела смањењу све веће количине овог ефлуента на тржишту.

На основу описаног предмета докторске дисертације, у другом поглављу чији је назив **Циљеви истраживања**, јасно и недвосмислено је формулисан основни циљ, при чему је наведено да је његово остварење омогућено реализацијом специфичних циљева који су прецизно дефинисани у логичном низу.

Треће поглавље, **Преглед литературе**, садржи у пет целина систематизоване податке из релевантне доступне научне и стручне литературе који се односе на област истраживања докторске дисертације. У оквиру прве целине, **Ксантан - микробиолошки биополимер**, наведене су основне структурне карактеристике молекула ксантана, као и најважнија функционална својства његових раствора, која су одговорна за широку индустријску примену овог комерцијално најзначајнијег бактеријског хетерополисахарида. Опис свих фаза проучавањем биотехнолошког поступка уз јасно навођење публикованих сазнања о установљеним узрочно-последичним везама између метаболичке активности производног микроорганиzма и појединих фаза производње ксантана, дат је у другој целини, **Биотехнолошка производња ксантана**. Научној и стручној јавности саопштене претходно доказане чињенице указују на значај одабира одговарајућег биокатализатора, што је уско повезано са формулисањем оптималног састава индустријских култивационих медијума, а нарочито оних који у својој основи садрже сировине нестандардног састава, као и са оптимизацијом услова извођења биопроцеса чиме треба да се обезбеде високи приноси микробиолошког секундарног метаболита, ксантана. Трећа целина, **Сирови глицерол из производње биодизела као сировина за биотехнолошке процесе**, даје преглед основних квалитативних и квантитативних карактеристика сировог глицерола којег генерише индустрија биодизела у свету, али и код нас. Узимајући у обзир количину сировог глицерола која се добија по сваком литру произведеног биодизела, као и установљене предикције раста ове гране индустрије широм света, процењене су количине сировог глицерола које ће се бити на располагању, као и његова тржишна вредност. Додатно, за територију Републике Србије извршено је мапирање региона у којима су лоцирани његови генератори. Такође, дата су и теоријска разматрања о могућностима валоризације сировог глицерола у биотехнолошкој производњи на основу његових уобичајених својстава, а описани су и примери у којима су овакве могућности експериментално доказане на лабораторијском нивоу. У четвртном поглављу, **Унапређење биотехнолошког поступка производње ксантана**, изложене су активности које је потребно спровести како би се унапредио постојећи или развио нови одрживи биотехнолошки поступак производње овог биополимера, а посебна пажња је

посвећена систематизацији најважнијих резултата досадашњих лабораторијских испитивања у којима су са циљем производње ксантана различити сојеви рода *Xanthomonas* култивисани на медијумима са чистим и/или сировим глицеролом. Последњи, пети део, који носи назив **Моделовање и оптимизација биотехнолошких процеса**, садржи теоријске основе поступака и метода статистичког планирања експеримената, математичког моделовања и оптимизације за које литература наводи да се успешно примењују у биотехнологији.

Четврто поглавље, **Материјал и методе**, подељено је у осам целина. У првој целини наведено је да су поред референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 као производни микроорганизми коришћени и локални изолати рода *Xanthomonas*, и то сојеви *Xanthomonas campestris* изоловани са листова биљака из породице купусњача, као и сојеви *Xanthomonas euvesicatoria* изоловани са листова паприка. Све примењене сировине набројане су у другој целини, где су дате и формулације култивационих медијума који су употребљени за припрему инокулула и биосинтезу ксантана, а детаљно су описани и начини њихове припреме. Услови припреме инокулула, биосинтезе ксантана и његовог издвајања из култивационих медијума прецизирани су у наставку, односно у трећој, четвртој и петој целини, редом, тако да је омогућена поновљивост извођења експеримената у лабораторијским размерама. У оквиру шесте целине наведени су лабораторијски аналитички поступци за карактеризацију сировог глицерола, као и они који се уобичајено користе у контроли биотехнолошке производње у свим њеним фазама и у анализи добијеног производа. Таксативно су наведене и адекватно цитиране све стандардне методе, као и оне које се широко користе у научно-истраживачком раду. Поред тога, детаљно су описани поступци припреме узорака пре самог анализирања и евентуалне модификације метода рада. Примењене методе систематизације и обраде резултата из под идентичним условима поновљених експеримената, као и начини приказа добијених података, дате су седмој целини, у којој су наведени и софтверски пакети коришћени за статистичку обраду података. У осмој целини, наведене су методе планирања експеримента, математичког моделовања и оптимизације, и набројани у ту сврху примењени математички модели и коришћени софтверски пакети.

Резултати и дискусија су пето, а уједно и најобимније поглавље у коме су приказани резултати експерименталног рада, као и резултати статистичке обраде, али и математичког моделовања и оптимизације проистекли из активности реализованих у складу са предложеним програмом истраживања који је изложен у пријави теме дисертације. Један део истраживања односи се на експериментално испитивање могућности биосинтезе ксантана различитим сојевима рода *Xanthomonas* на култивационим медијумима са варираним изворима угљеника, што обухвата и избор одговарајућег биокатализатора за успешну реализацију биопроцеса на медијуму са сировим глицеролом као јединим извором угљеника, као и извођење биопроцеса у дефинисаним условима биосинтезе, али у различитом трајању. У оквиру другог дела истраживања, применом статистичких и математичких метода анализирани су резултати огледа реализованих у складу са изабраним експерименталним плановима, а затим су генерисани математички модели који описују утицај варираних параметара на одабране показатеље успешности испитиваног биопроцеса. Даље је изведена оптимизација вредности варираних параметара методом жељене функције у комбинацији са генерисаним математичким моделима. Сви резултати су систематизовани и приказани прегледно, на одговарајући начин, табеларно или графички. Дискусија резултата је разложна и концизна, а њихово тумачење критичко и уз осврт на претходно публиковане резултате других аутора.

Поглавље је подељено у шест целина наведених логичним редоследом који прати ток истраживања. У првој целини, **Скрининг могућности биосинтезе ксантана применом сојева *Xanthomonas spp.* на медијумима са различитим изворима угљеника**, приказани су резултати експеримената у којима је испитана могућност биосинтезе ксантана на медијумима са глукозом и комерцијалним глицеролом, применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 и локалних изолата рода *Xanthomonas*, при чему је доказано да сви испитивани сојеви поседују способност продукције ксантана одговарајућег квалитета на медијуму са комерцијалним глицеролом. Друга целина, **Карактеризација сировог глицерола из производње биодизела у Републици Србији**, садржи резултате анализе састава сировог глицерола генерисаног у домаћој фабрици за добијање биодизела из отпадног уља, који је примењен као сировина у наставку ових истраживања. Приказани резултати разматрани су првенствено из угла захтева биотехнолошке производње на теоријском нивоу. У трећој целини, **Скрининг могућности биосинтезе ксантана применом сојева *Xanthomonas spp.* на медијуму са сировим глицеролом**, представљени су резултати експеримената у којима је испитана могућност биосинтезе ксантана на медијуму са сировим глицеролом као јединим извором угљеника, применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 и локалних изолата рода *Xanthomonas*, при чему је доказана могућност извођења биопроцеса свим испитиваним сојевима у примењеним експерименталним условима. На основу количине и квалитета биосинтетисаног ксантана издвојени су одређени сојеви који су култивисани на истом медијуму, под идентичним условима, али у увећаним размерама (Вулфова боца запремине 2 l)

како би се одабрао производни сој који ће се користити у наставку истраживања. У четвртој целини, **Стандардизација припреме инокулума за биосинтезу ксантана на медијуму са сировим глицеролом**, приказани су резултати статистички дизајнираних експеримената изведених у четири фазе где су, применом савремених метода за математичко моделовање и оптимизацију биопроцеса, дефинисани оптимални односи најпогоднијих састојака медијума за другу фазу умножавања одабраног производног соја, утврђене њихове оптималне почетне концентрације, као и концентрација инокулума у медијуму за биосинтезу, а оптимизовано је и укупно време трајања припреме инокулума. Пета целина, **Формулација састава медијума са сировим глицеролом за биосинтезу ксантана**, посвећена је дефинисању оптималних почетних концентрација макронутријената у производном медијуму, за шта је, као и у претходној фази истраживања, примењено статистичко планирање експеримената у комбинацији са савременим методама моделовања и оптимизације биопорцеса. Последња, односно шеста целина, **Испитивање тока биосинтезе ксантана на медијуму са сировим глицеролом у увећаним размерама**, подразумевала је умножавање одабраног производног соја стандардизованим поступком, а затим и његову култивацију у лабораторијским биореакторима одговарајућих конструкционих карактеристика и различитих укупних запремина, на медијуму претходно формулисаним састава. Утврђене вредности показатеља тока и показатеља успешности биосинтезе ксантана указују на могућност скраћења времена трајања биопроцеса.

У шестом поглављу, под називом **Закључци**, систематизовани су општи закључак и специфични закључци који су концизни и разложно изведени из добијених резултата и њихове дискусије, а у складу су са постављеним основним и специфичним циљевима ове докторске дисертације.

Поглавље број седам је **Литература** и садржи 167 литературних навода који су прегледно систематизовани и цитирани на уобичајен и правилан начин. Изабране референце су релевантне, актуелне и примерене проучаваној тематици.

Последње, односно осмо поглавље ове докторске дисертације је **Прилог**, а састоји се из два дела. У првом делу су, у 13 табела приказани резултати мерења вредности рН и/или садржаја укупних растворених соли у медијумима за биосинтезу ксантана. У још три табеле представљени су резултати додатне статистичке обраде података, док две табеле садрже вредности реолошких параметара одређене за медијуме оптимизоване формулације током извођења огледа у увећаним размерама. Други део овог поглавља чине графички прикази успешности фитовања експериментално добијених резултата одабраним математичким моделом, односно на укупно осам слика приказано је поређење реалних и моделом предвиђених вредности посматраних одзива.

Поред наведених поглавља дисертацију чине и **Садржај, Списак ознака, симбола и скраћеница, Списак табела и Списак слика**, који претходе основном тексту и посебно су пагинирани. На крају рада наведена је **Кључна документацијска информација** са сажетком на српском и енглеском језику, а иза ње дат је **План третмана података**.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

M23 - Рад у међународном часопису

Zahović I, Dodić J, Markov S, Grahovac J, Grahovac M, Trivunović Z: Screening of local wild-type *Xanthomonas* spp. for xanthan biosynthesis using media with different carbon sources. Romanian Biotechnological Letters, 2021, Vol. 26, No. 4, pp. 2800-2807.

IF 2019: 0.765 (Biotechnology & Applied Microbiology – 153/156)

M24 - Рад у часопису међународног значаја верификован посебном одлуком

Zahović I, Dodić J, Grahovac J, Grahovac M, Trivunović Z: The effect of cultivation time on xanthan production by *Xanthomonas* spp. on glycerol containing medium. Acta Periodica Tehnologica, 2021, In press.

M51 - Врхунски часопис националног значаја

Rončević Z, Zahović I, Danilović N, Dodić S, Grahovac J, Dodić J: Potential of different *Xanthomonas campestris* strains for xanthan biosynthesis on waste glycerol from biodiesel production. Journal on Processing and Energy in Agriculture, 2020, Vol. 24, No. 2, pp. 62-66.

M63 - Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини

Zahović I, Trivunović Z: Valorizacija otpadnog glicerola u biotehnoškoj proizvodnji ksantana: odabir proizvodnog soja. Knjiga radova, VIII Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine „Docent dr Milena Dalmacija“, 1-2. april, 2021, Novi Sad, Srbija, UO-02.

Zahović I, Rončević Z, Dodić S, Grahovac J, Dodić J: Ispitivanje mogućnosti iskorišćenja otpadnog glicerola u biotehnoškoj proizvodnji ksantana. Knjiga radova, VII Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine „Docent dr Milena Dalmacija“, 1-2. april, 2019, Novi Sad, Srbija, UO-04.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Истраживања реализована у оквиру ове докторске дисертације проистекла су из потражње за одговарајућом сировином, што ниже тржишне вредности, која би у биотехнолошкој производњи ксантана представљала адекватну замену за стандардно примењиване изворе угљеника у медијумима за биосинтезу, али и из потребе за развојем одрживог поступка за искоришћење сировог глицерола из производње биодизела, чије се генерисање интензивира услед проширења капацитета за добијање овог биогорива. Оптимизацијом производње ксантана у примењеним експерименталним условима, метаболичком активношћу локалног изолата *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 4, на сировом глицеролу којег генерише индустрија биодизела на територији Републике Србије, стандардизован је поступак припреме инокулума и формулисан је састав медијума за биосинтезу. Стандардизацијом припреме инокулума дефинисани су оптимални односи најпогоднијих састојака медијума за другу фазу умножавања одабраног производног соја, утврђене су њихове оптималне почетне концентрације, као и концентрација инокулума у медијуму за биосинтезу, а скраћено је и укупно време трајања припреме инокулума. Након формулације састава медијума за биосинтезу чија је основа сирови глицерол, где су дефинисане оптималне почетне концентрације макронутријената, потврђена је успешност извођења биопроцеса у увећаним размерама уз могућност скраћења времена трајања биопроцеса. Резултати ових истраживања имају научни значај јер доприносе разумевању утицаја испитиваних параметара из појединих сегмената биопроцеса на жељену метаболичку активност локалног изолата *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 4, док са технолошког аспекта представљају поуздан извор информација за додатно увећање размера биопроцеса и даљи развој испитиваног биотехнолошког поступка за искоришћење сировог глицерола у циљу добијања биополимера широке употребне и значајне тржишне вредности.

У наставку су наведени специфични закључци изведени на основу резултата истраживања из оквира ове дисертације.

- Резултати истраживања која су обухватала скрининг могућности биосинтезе ксантана на полусинтетичким медијумима са различитим изворима угљеника, применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, сојева рода *Xanthomonas campestris*, изолованих са листова биљака из породице купусњача и сојева *Xanthomonas euvesicatoria*, изолованих са листова паприка, указују да сви испитивани сојеви рода *Xanthomonas* поседују способност продукције ксантана на медијумима са глукозом и комерцијалним глицеролом. Поред тога, утврђено је и да су локални изолати са листова биљака из породице купусњача продуктивнији у присуству глукозе, док локални изолати са листова паприка у већој мери биосинтезишу ксантан на медијуму са комерцијалним глицеролом. Добијени резултати показују и да је приликом култивације испитиваних изолата рода *Xanthomonas* на медијуму са комерцијалним глицеролом дошло до биосинтезе ксантана који су, према средњим вредностима молекулских маса, бољег квалитета у односу на ксантане које су исти производни сојеви, у примењеним експерименталним условима, биосинтетисали на медијуму са глукозом. На крају ове фазе истраживања констатовано је да су се међу испитиваним сојевима, као најпродуктивнији на медијуму са комерцијалним глицеролом, издвојили сој KUPUS из групе изолата са листова биљака из породице купусњача, и сој PAP LIST 4, из групе изолата са листова паприка.
- Сирови глицерол, који је коришћен у овим истраживањима као сировина за припрему култивационих медијума за различите фазе биотехнолошке производње ксантана, садржи изворе угљеника и фосфора, као и одређене минералне материје, који су неопходни за раст и размножавање производног микроорганизма, али и за биосинтезу ксантана. Све поменуте компоненте, осим извора азота, присутне су у сировом глицеролу у концентрацији која омогућава неометано одвијање метаболичких активности бактерија рода *Xanthomonas*.
- Резултати скрининга могућности биосинтезе ксантана на медијуму са сировим глицеролом, применом референтног соја и локалних изолата рода *Xanthomonas*, показују да је култивација свих испитиваних сојева, у примењеним експерименталним условима, резултовала продукцијом ксантана

различитог квалитета. Утврђено је и да је време трајања култивације за које се постиже максимална концентрација биополимера одговарајућег квалитета краће за сојеве изоловане са листова паприка у односу на припаднике истог бактеријског рода изоловане са листова биљака из породице купусњача. Међу изолатима са листова паприка, ксантан у највећој количини продуковао је сој PAP LIST 4, док су ксантан најбољег квалитета биосинтетисали сојеви PAP LIST 3 и PAP LIST 4. Најпродуктивнији сојеви из групе изолата са листова биљака из породице купусњача на медијуму са сировим глицеролом били су сојеви ATCC 13951, 12-2, KARFIOL, KUPUS, Am и Xp 7-2, а ксантан најбољег квалитета биосинтетисали су сојеви Xp 3-1, Am и KARFIOL.

- Будући да се, приликом скрининга могућности биосинтезе ксантана на медијуму са сировим глицеролом, ниједан од испитиваних сојева није издвојио значајно, а како би се одабрао сој који ће се користити у наставку истраживања за унапређење предложеног биотехнолошког поступка за искоришћење поменутог ефлuenta индустрије биодизела, извршено је поређење успешности биосинтезе ксантана у увећаним размерама (Вулфова боца запремине 2 l) применом појединих производних сојева. Као најпогоднији, у овој фази истраживања, истакао се сој PAP LIST 4 који је у даљим испитивањима коришћен као производни микроорганизам.
- Резултати прве фазе оптимизације састава медијума за припрему инокулума, која је извршена у циљу супституције дела глукозе у медијуму за другу фазу умножавања соја PAP LIST 4 са глицеролом, констатовано је да је медијум најпогодније формулације онај са 40% глукозе и 60% сировог глицерола. Утврђено је да, увођењем овог медијума у припремне фазе биотехнолошког поступка производње ксантана на медијуму са сировим глицеролом, долази до повећања садржаја продукованог биополимера за нешто више од 20%, у односу на претходну фазу истраживања.
- У другој фази оптимизације састава медијума за припрему инокулума, која је изведена како би се у медијуму за другу фазу умножавања соја PAP LIST 4 дефинисао однос састојака са азотом, утврђено је да је медијум најпогодније формулације онај са 100% сладног екстракта, уз додатак 40% глукозе и 60% сировог глицерола. Овом модификацијом постигнуто је да се садржај ксантана у производном медијуму са сировим глицеролом по завршетку биопроцеса повећа за нешто више од 10%, у односу на претходну фазу истраживања.
- Трећа фаза оптимизације састава медијума за припрему инокулума имала је за циљ дефинисање оптималног почетног садржаја одабраних састојака медијума за другу фазу умножавања соја PAP LIST 4, као и оптималне концентрације инокулума која се додаје у медијум за биосинтезу. Резултати спроведене оптимизације указују да је за другу фазу припреме инокулума најпогодније применити медијум са 5 g/l глукозе и сировог глицерола (додатих у односу 40:60) и 5 g/l сладног екстракта, док је оптимална концентрација инокулума која се додаје у медијум за биосинтезу 5%(v/v). Вредности свих варираних параметара смањене су за 50% у односу на претходну фазу истраживања без негативног утицаја на количину продукованог биополимера.
- Приликом оптимизације времена трајања припреме инокулума констатовано је да оптимално време трајања прве фазе умножавања соја PAP LIST 4 износи 36 h, а друге 48 h. У односу на претходну фазу истраживања, у овом кораку остварено је смањење времена трајања умножавања производног микроорганизма у првој фази припреме инокулума за 25%, што се није одразило на успешност извођења целог производног поступка.
- Оптимизација састава медијума са сировим глицеролом за биосинтезу ксантана, у погледу почетног садржаја глицерола и почетног садржаја извора азота (екстракт квасца и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), резултовала је закључком да је медијум најпогодније формулације онај са 16,15 g/l глицерола и 3,00 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Култивацијом соја PAP LIST 4 на медијуму са сировим глицеролом оптимизоване формулације, у примењеним експерименталним условима, биосинтетише се ксантан у концентрацији која је за 29,59% већа у односу на претходну фазу истраживања.
- Приликом оптимизације медијума са сировим глицеролом за биосинтезу ксантана, у погледу почетног садржаја извора фосфора, констатовано је да је медијум најпогодније формулације онај са 2,5 g/l K_2HPO_4 . У поређењу са претходном фазом истраживања може се закључити да је у овом кораку количина фосфатне соли која се додаје у медијум за биосинтезу смањена за 16,67% без негативног утицаја на метаболичку активност соја PAP LIST 4 и принос биополимера.
- Последња фаза истраживања обухватала је умножавање соја PAP LIST 4 у стандардизованим условима, а затим и његову култивацију у увећаним размерама (лабораторијски биореактори укупне запремине 3 l и 14 l) на медијуму са сировим глицеролом оптимизоване формулације. На основу добијених резултата констатовано је да је већа успешност биопроцеса остварена приликом биосинтезе у лабораторијском биореактору укупне запремине 14 l због повољнијих услова мешања и аерације, те да се време трајања биосинтезе у том случају може скратити за 72 h. У наведеном огледу биосинтетисан је ксантан одговарајућег квалитета у концентрацији од 13,95 g/l, чиме је

остварен значajan stepen konverzije glicerola u ksantan, i to od 98,44%. Vrednosti konverzije glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora ostvarene u ovoj fazi istrazivanja iznosile su 85,39%, 69,01% i 43,72%, redom.

- Kulтивacija soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 l, na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovane formulacije, rezultuje biosintezom ksantana чији су садржај и молекулска маса већи за око 39% и 20% у односу на ksantan продукован у фази иницијалног скрининга могућности biosinteze ksantana на медијуму са сировим глицеролом применом истог производног соја. Поред тога, утврђено је да се приликом извођења оптимизованог поступка производње ksantana применом соја PAP LIST 4 у увећаним размерама (лабораторијски биореактор запремине 14 l) остварује степен конверзије глицерола и укупног фосфора већи за више од 29%, док је конверзија укупног азота већа за готово 60% у односу на вредности остварене када је култивација поменутог соја вршена у мањим размерама (Вулфова боца запремине 2 l) у оквиру одабира производног соја за biosintezu ksantana на медијуму са сировим глицеролом.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Приказ резултата докторске дисертације је, у складу са дефинисаним циљевима, подељен у адекватно конципиране сегменте, који сваки за себе представља целину. Резултати истраживања проистекли су из оригинално планираних лабораторијских експеримената, систематизовани су у логичне целине, обрађени рачунски и статистички, и приказани прегледно и јасно табеларно и графички. На основу студиозне дискусије и тумачења добијених резултата, које је изведено уз повезивање са резултатима других аутора у области biosinteze ksantana, изведени су одговарајући закључци.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Докторска дисертација је у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Докторска дисертација садржи све битне елементе који се захтевају за публикације овакве врсте.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Истраживањима из оквира ове докторске дисертације обухваћена је карактеризација сировог глицерола из домаћег погона за производњу биодизела на отпадном уљу, превасходно у погледу материја које су од значаја за неометану активност испитиваних биокатализатора. Подаци о детектованом саставу и процењеној количини сировог глицерола пружају јасан увид у доступност и квалитет овог ефлуента у нашој земљи, али и потенцијал његове валоризације у биотехнолошкој производњи ksantana. Могућност искоришћења окарактерисаног ефлуената за biosintezu ksantana применом локалних изолата рода *Xanthomonas*, чија култивација на медијуму са сировим глицеролом до сада није описана у литератури, експериментално је доказана одређивањем квантитативних и квалитативних показатеља успешности биопроцеса. Утврђено је да је продукција жељеног метаболита генетска карактеристика соја, али и да се припадници различитих врста значајно разликују у погледу метаболисања сировог глицерола и biosinteze ksantana. Поред тога, установљено је да се успешност испитиваног биопроцеса применом одабраног производног соја може побољшати адекватном стандардизацијом припреме инокулума и одговарајућом формулацијом састава медијума за biosintezu. За извођење ове две значајне фазе истраживања докторске дисертације примењено је статистичко планирање експеримената у комбинацији са савременим методама моделовања и оптимизације биопроцеса. Применом поступка одзивне површине, а на основу резултата реалних испитивања, генерисани су математички модели који описују утицај испитиваних параметара, као и њихових интеракција на показатеље успешности биопроцеса, али и олакшавају његову оптимизацију на лабораторијском нивоу, што је предуслов за увећање размера које води ка потенцијалној индустријализацији предложеног производног поступка. Готово сва истраживања из доступне научне базе података, која за циљ имају развој биотехнолошког поступка производње ksantana на сировом глицеролу, такође започињу изолацијом нових производних микроорганизама и доказивањем, односно унапређењем њихових производних карактеристика, али се завршавају оптимизацијом састава медијума и услова производње на нивоу ерленмајера. Међутим, истраживања у оквиру ове докторске дисертације су отишла даље јер је производни поступак развијен до биореактора укупне запремине 14 l. Превођење биопроцеса из ерленмајера, које је карактеристично по екстерном мешању и спонтаној аерацији, на ниво лабораторијског биореактора, где је мешање интерно, а аерација се изводи увођењем ваздуха, представља велики изазов код трансфера технологије. Аутентични

результати ових истраживања објављени су у међународним и националним научним часописима, а саопштени су и на скуповима националног значаја, чиме се потврђује да докторска дисертација представља оригиналан допринос науци.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

Недостаци докторске дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију маг. инж. технологије Иде Е. Заховић, под насловом „**Оптимизација производње ксантана на сировом глицеролу применом локалног изолата *Xanthomonas* sp.**“ и предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидаткињи одобри одбрана.

Нови Сад, 12.10.2021. године

Др Јелена Додић, редовни професор,
председник комисије

Др Зорана Тривуновић, доцент
ментор, члан комисије

Др Бојана Даниловић, ванредни професор
члан комисије