



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKE NAUKE

**PRIRODNI KOAGULANTI IZ ZRNA PASULJA  
(*Phaseolus vulgaris*) U OBRADI VODE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
Prof. dr Marina Šćiban

Kandidat:  
dipl. inž. Jelena Prodanović

Novi Sad, 2015. godine

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I CILJ RADA</b> .....	1
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	2
<b>2.1. TEORIJA KOAGULACIJE I FLOKULACIJE</b> .....	2
<b>2.1.1. Stabilnost čestica u vodi</b> .....	2
2.1.1.1. <i>Interakcije između čestica i rastvarača</i> .....	3
2.1.1.2. <i>Električne osobine čestica</i> .....	3
2.1.1.3. <i>Stabilnost čestica</i> .....	5
2.1.1.4. <i>Kompresija dvojnog električnog sloja</i> .....	6
<b>2.1.2. Teorija koagulacije</b> .....	7
2.1.2.1. <i>Adsorpcija i neutralizacija naelektrisanja</i> .....	7
2.1.2.2. <i>Adsorpcija i obrazovanje mostova</i> .....	8
2.1.2.3. <i>Sweep koagulacija</i> .....	9
<b>2.1.3. Vrste koagulanata/flokulanata</b> .....	10
2.1.3.1. <i>Neorganski koagulanti na bazi metala</i> .....	10
2.1.3.2. <i>Predhidrolizovane soli metala</i> .....	12
2.1.3.3. <i>Organski polimeri</i> .....	13
<b>2.1.4. Teorija flokulacije</b> .....	14
2.1.4.1. <i>Mikroflokulacija (perikinetička flokulacija)</i> .....	15
2.1.4.2. <i>Makroflokulacija (ortokinetička flokulacija)</i> .....	15
2.1.4.3. <i>Diferencijalno taloženje</i> .....	15
<b>2.1.5. Faktori koji utiču na koagulaciju i flokulaciju</b> .....	16
2.1.5.1. <i>Temperatura</i> .....	16
2.1.5.2. <i>Mešanje</i> .....	16
2.1.5.3. <i>pH</i> .....	16
2.1.5.4. <i>Prisustvo POM</i> .....	17
2.1.5.5. <i>Mutnoća</i> .....	17
<b>2.1.6. Simulacija procesa koagulacije/flokulacije</b> .....	17
<b>2.2. PREDNOSTI I NEDOSTACI TRADICIONALNIH KOAGULANATA I FLOKULANATA</b> .....	17
<b>2.3. PRIRODNI KOAGULANTI</b> .....	19
<b>2.3.1. Ekstrakcija prirodnih koagulanata</b> .....	21
<b>2.3.2. Uticaj prirodnih koagulanata na parametre vode koja se obrađuje</b> .....	23
<b>2.3.3. Prečišćavanje prirodnih koagulanata</b> .....	24

2.3.3.1. Prečišćavanje prirodnih koagulanata primenom hromatografije sa izmenom jona ...	25
2.3.3.2. Prečišćavanje prirodnih koagulanata izdvajanjem nepolarnih materija ekstrakcijom fluidima u superkričnom stanju i Soxhlet ekstrakcijom.....	29
2.3.3.3. Prečišćavanje prirodnih koagulanata frakcionisanjem ultrafiltracijom .....	31
2.3.3.4. Istraživanja vezana za prečišćavanje prirodnih koagulanata .....	32
<b>2.3.4. Karakterizacija i mehanizam dejstva prirodnih koagulanata .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.5. Parametri koji utiču na efikasnost prirodnih koagulanata .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.6. Rok trajanja prirodnih koagulanata.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.7. Primena prirodnih koagulanata za obradu različitih voda i otpadnih voda .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3.8. Poređenje efikasnosti prirodnih i tradicionalnih koagulanata .....</b>	<b>39</b>
<b>2.3.9. Pasulj kao mogući izvor prirodnih koagulanata .....</b>	<b>42</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. EKSTRAKCIJA PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1. Prečišćavanje prirodnih koagulanata jonoizmenjivačkom hromatografijom .....</b>	<b>44</b>
3.2.1.1. Prečišćavanje prirodnih koagulanata katjonitima Amberlite <sup>TM</sup> IR 120Na i Wofatit (šaržno) .....	44
3.2.1.2. Prečišćavanje prirodnih koagulanata anjonitom Amberlite <sup>TM</sup> IRA 958Cl (šaržno) ...	45
3.2.1.3. Prečišćavanje prirodnih koagulanata anjonitom Amberlite <sup>TM</sup> IRA 900Cl (šaržno) ...	45
3.2.1.4. Prečišćavanje prirodnih koagulanata anjonitom Amberlite <sup>TM</sup> IRA 900Cl (kolonska hromatografija) .....	46
<b>3.2.2. Frakcionisanje prirodnih koagulanata iz zrna pasulja ultrafiltracijom .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.3. Izdvajanje nepolarnih komponenti iz zrna pasulja ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju .....</b>	<b>47</b>
3.2.3.1. Određivanje stepena usitnjenosti i ujednačenosti veličina čestica biljnog materijala.....	48
3.2.3.2. Ekstrakcija lipidnih materija .....	49
<b>3.3. MODEL VODA .....</b>	<b>50</b>
<b>3.4. OTPADNE VODE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.5. TESTOVI KOAGULACIJE .....</b>	<b>52</b>
<b>3.6. ANALITIČKE METODE .....</b>	<b>52</b>
<b>3.7. METODA ODZIVNE POVRŠINE .....</b>	<b>53</b>
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1. UTICAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA EKSTRAKCIJU PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.1. Uticaj vremena trajanja ekstrakcije na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata.....</b>	<b>54</b>

4.1.2. Uticaj temperature pri ekstrakciji na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata .....	55
4.1.3. Uticaj vrste primenjenog ekstragensa na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata .....	56
4.1.4. Uticaj primene filtracije na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata.....	61
4.2. SASTAV EKSTRAKTA ZRNA PASULJA .....	63
4.2.1. Ekstrakti celog zrna pasulja dobijeni ekstrakcijom sa destilovanom vodom u trajanju od 10 minuta i 3 sata .....	63
4.2.2. Ekstrakti celog zrna pasulja dobijeni ekstrakcijom sa destilovanom vodom, 0,5 M NaCl i 1 M NaCl u trajanju od 10 minuta .....	64
4.2.3. Ekstrakti celog zrna pasulja, jezgra i pokožice dobijeni ekstrakcijom sa 0,5 M NaCl u trajanju od 10 minuta.....	65
4.3. KOAGULACIONA SVOJSTVA EKSTRAKATA OPNE, JEZGRA I CELOG ZRNA PASULJA ..	66
4.4. TRAJNOST I ČUVANJE SIROVOG EKSTRAKTA PASULJA .....	68
4.5. UTICAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA KOAGULACIJU PRIRODNIM KOAGULANTIMA IZ PASULJA .....	71
4.5.1. Uticaj različitih sredstava za podešavanje pH model vode na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja .....	71
4.5.2. Uticaj dužine brzog mešanja na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja.....	72
4.5.3. Uticaj dužine sporog mešanja na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja.....	72
4.5.4. Određivanje optimalnog vremena taloženja .....	73
4.5.6. Odnos početne mutnoće model vode i primenjene doze koagulanta .....	74
4.5.7. Uticaj pH vrednosti model vode na koagulacionu aktivnost ekstrakata pasulja....	77
4.6. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA JONOIZMENJIVAČKOM HROMATOGRAFIJOM.....	80
4.6.1. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na katjonitima Amberlite™ IR 120Na i Wofatit (šaržno) .....	81
4.6.2. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitima: Amberlite™ IRA 958Cl (šaržno).....	84
4.6.3. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitima: Amberlite™ IRA 900Cl (šaržno).....	89
4.6.4. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitima: Amberlite™ IRA 900Cl (kolonska hromatografija).....	99
4.7. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA FRAKCIONISANJEM ULTRAFILTRACIJOM.....	110
4.8. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA IZDVAJANJEM NEPOLARNIH KOMPONENTI SUPERKRITIČNOM EKSTRAKCIJOM SA CO <sub>2</sub> .....	116
4.8.1. Uticaj pritiska, temperature i vremena trajanja superkritične ekstrakcije pasulja na prinos ekstrakcije .....	116
4.8.2. Soxhlet ekstrakcija lipidnih komponenti .....	118

<b>4.8.3. Koagulaciona aktivnost ekstrakata dobijenih ekstrakcijom iz iscrpljenog pasulja .....</b>	<b>118</b>
<b>4.9. UTICAJ SADRŽAJA RAZLIČITIH JONA NA KOAGULACIONU AKTIVNOST PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA .....</b>	<b>120</b>
<b>4.10. UTICAJ PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA NA SADRŽAJ ORGANSKIH MATERIJA U OBRADENOJ VODI.....</b>	<b>125</b>
<b>4.11. PRIMENA EKSTRAKTA PASULJA ZA OBRADU RAZLIČITIH OTPADNIH VODA .....</b>	<b>129</b>
<b>4.12. PRIMENA PRIRODNIH KOAGULANATA IZ PASULJA U KOMBINACIJI SA ALUMINIJUMOM KAO TRADICIONALNIM KOAGULANTOM .....</b>	<b>140</b>
<b>4.13. KARAKTERIZACIJA I MOGUĆNOST PRIMENE ISCRPLJENOG PASULJA NAKON EKSTRAKCIJE PRIRODNIH KOAGULANATA.....</b>	<b>143</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>145</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>154</b>

## 1. UVOD I CILJ RADA

Jedan od osnovnih uslova za razvoj ljudskih naselja je oduvek bio obezbeđivanje i održavanje adekvatnih izvora vode. Ranije kroz istoriju, primarna briga ljudi je bila obezbediti dovoljnu količinu vode. Međutim, sa povećanjem populacije sve je veći pritisak na ograničene izvore površinskih voda visokog kvaliteta, a kontaminacija vode komunalnim, poljoprivrednim i industrijskim otpadom je dovela do pogoršanja kvaliteta vode. U isto vreme, zakonska regulativa vezana za kvalitet vode postaje sve strožija, analitičke metode za određivanje kontaminanata sve osetljivije, a javnost generalno bolje informisana o značaju kvaliteta vode. U suštini, sve vode iz prirode koje će se koristiti u neke svrhe zahtevaju određeni tretman.

Obrada vode se može definisati kao tretman vode kako bi se postigao kvalitet vode koji zadovoljava određene ciljeve i standarde. Ciljevi i standardi mogu uključivati zahteve u pogledu kvaliteta vode postavljene od strane regulatornih tela, dodatne zahteve postavljene od strane lokalne zajednice i zahteve povezane sa specifičnostima nekog industrijskog procesa.

Vode u prirodi sadrže neorganske i organske čestice. Neorganske čestice, uključujući glinu, mulj i mineralne okside, u vode dospevaju prirodnim procesima erozije. Organske čestice mogu uključivati viruse, bakterije, alge, ciste protozoa i oociste. Dodatno, vode mogu sadržati veoma fine koloidne i rastvorene organske konstituente, kao što su huminske kiseline, proizvod raspadanja i izluživanja iz organskih ostataka.

Najčešće primenjivani metod za uklanjanje suspendovanih i koloidno rastvorenih čestica i dela prirodnih organskih materija (POM) iz voda su koagulacija i flokulacija praćeni sedimentacijom i/ili filtracijom. Koagulacija podrazumeva dodatak jednog ili više koagulanata u cilju pripreme suspendovanih, koloidnih i rastvorenih materija za postupak flokulacije koji sledi ili u cilju stvaranja uslova koji će omogućiti uklanjanje čestica i rastvorenih materija. Flokulacija je agregacija destabilizovanih čestica (čestica čije je površinsko naelektrisanje smanjeno), nastalih dodatkom koagulanta, u krupnije čestice, koje se nazivaju flokule.

Koagulacija i flokulacija nisu novi postupci. 1500-te godine pre nove ere, Egipćani su koristili aluminijum kako bi postigli izdvajanje suspendovanih čestica iz vode. Slike uređaja za bistenje su bile naslikane na zidovima grobnice Amenofisa II u Tebi i kasnije u grobnici Ramzesa II (Crittenden et al., 2012). Pred kraj XIX veka (1897.) G.W. Fuller otkriva da je uklanjanje bakterija filtracijom na peščanom filtru mnogo efikasnije kada filtraciji prethodi dobro izvedena koagulacija i sedimentacija (Crittenden et al., 2012).

U današnje vreme za koagulaciju i flokulaciju se najčešće primenjuju neorganske soli metala (soli aluminijuma i gvožđa) i sintetski organski polimeri. Ovi koagulant/flokulanti imaju niz nedostataka, te se u naučnoj zajednici teži pronalasku alternativnih koagulanata. U tom smislu, u poslednje dve decenije se intenzivno istražuju koagulant dobijeni iz prirodnih izvora – prirodni koagulant. Cilj ovog rada je da se ispita mogućnost dobijanja prirodnih koagulanata iz zrna pasulja kao lako dostupnog i obnovljivog izvora.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. TEORIJA KOAGULACIJE I FLOKULACIJE

Bistrenje vode je tehnološki postupak kojim se iz vode uklanjaju suspendovane čestice, koloidne čestice i deo rastvorenih materija, a koje uslovljavaju mutnoću vode. Uklanjanje čestica je neophodno jer:

- čestice smanjuju bistrinu vode do neprihvatljivog nivoa (tj. povećavaju mutnoću vode) i daju vodi boju (estetski razlozi),
- mogu ometati dezinfekciju vode,
- mogu biti infektivni agensi (na primer virusi, bakterije i protozoe), i
- toksične materije i infektivni agensi mogu biti adsorbovani na njihovu površinu.

Bistrenje se može izvoditi na više načina, a jedan od njih je koagulacija i flokulacija, koje se primenjuju onda kada se čestice koje se žele ukloniti iz vode ne mogu ukloniti prirodnim taloženjem kao najjeftinijom metodom bistrenja vode. Takve čestice mutnoće su malih dimenzija i često male gustine, pa samim tim imaju malu brzinu taloženja. Pored toga, koloidne čestice su naelektrisane i poseduju električni dvojni sloj, što čini da se međusobno odbijaju, a podležu i Braunovom kretanju. Sve ovo zajedno doprinosi da se ovakve čestice mutnoće u vodi nalaze u stabilnoj disperziji, i da bi se iz nje uklonile, moraju se prethodno destabilizovati.

Postupak koagulacije se primenjuje upravo kako bi se prevazišli ovi faktori koji obezbeđuju stabilnost čestica mutnoće u vodi. Dodatkom koagulanata dolazi do destabilizacije čestica mutnoće, koje onda počinju da se približavaju i obrazuju agregate više čestica. Koagulacija se odvija u dve faze: 1) ravnomerno raspoređivanje dodatog koagulanta u celoj zapremini vode i 2) sorpcija koagulanta na površinu čestice i neutralizacija naelektrisanja. Obe ove faze se odvijaju dosta brzo. Flokulacija je proces koji se nadovezuje na koagulaciju. U procesu flokulacije destabilizovane čestice ili čestice nastale koagulacijom se međusobno povezuju, obrazujući veće aglomerate – flokule, koje nakon toga mogu biti uklonjene sedimentacijom i/ili filtracijom. Zadatak flokulacije je da obezbedi što intenzivniji kontakt između prethodno destabilizovanih čestica, i time omogući njihovo spajanje u flokule, a dodatno se intenzivira primenom blagog mešanja i dodatkom tzv. flokulanata – polielektrolita velike molekulske mase koji povezuju pojedinačne flokule u veće agregate. Iz napred rečenog se vidi da se procesi koagulacije i flokulacije ne mogu jasno razdvojiti, ali se ipak mogu razlikovati na osnovu vremena potrebnog za svaki od ova dva procesa. Koagulacija se standardno odvija za manje od 10 sekundi, dok je proces flokulacije znatno sporiji, i za njega je najčešće potrebno od 20 do 45 minuta.

#### 2.1.1. Stabilnost čestica u vodi

Vode u prirodi sadrže veoma širok spektar čestica. Tu spadaju neorganske čestice, kao što su čestice gline i oksida metala, različiti organski koloidi i mikroorganizmi, kao što su virusi, bakterije, protozoe i alge. Veličine ovih čestica se kreću u širokom opsegu, od nanometarskih veličina do milimetarskih veličina, i njihovo uklanjanje predstavlja izazov u tehnologiji obrade vode. U opsegu pH vrednosti koje su najčešće u vodama u prirodi (pH 5 – 9), većina čestica poseduje negativno naelektrisanje površine.

Za praktične potrebe, čestice u vodi se na osnovu svoje veličine mogu podeliti na suspendovane i koloidne. Kao što je napred rečeno, male suspendovane i koloidne čestice, kao i rastvorene materije se ne mogu istaložiti za dovoljno kratko vreme, pa se moraju dodati hemikalije koje pomažu uklanjanje ovih čestica. Da bi se razumela uloga koagulanata i flokulanata u ovom procesu, potrebno je objasniti interakcije između čestica i rastvarača, kao i električne osobine čestica prisutnih u vodi.

### **2.1.1.1. Interakcije između čestica i rastvarača**

Čestice u vodama u prirodi se mogu podeliti na hidrofobne (odbijaju molekule vode) i hidrofilne (privlače molekule vode). Hidrofobne čestice imaju jasno definisanu graničnu površinu između vode i čvrste faze i mali afinitet prema molekulima vode. Dodatno, hidrofobne čestice su termodinamički nestabilne, i tokom nekog perioda vremena će ireverzibilno agregirati.

Hidrofilne čestice, kao što su čestice gline, oksida metala, proteini ili huminske kiseline na svojoj površini imaju naelektrisanje grupe ili funkcionalne grupe koje jonizuju. Mnoge neorganske čestice koje se sreću u vodama u prirodi, uključujući hidratizane okside metala (oksidi gvožđa i aluminijuma), silicijum-dioksid ( $\text{SiO}_2$ ) i azbestna vlakna, su hidrofilne, i molekuli vode će se vezati za polarne ili jonizovane funkcionalne grupe. Mnoge organske čestice su takođe hidrofilne, a uključuju različite biokoloide (huminske kiseline, virusi) i suspendovane žive ili odumrle mikroorganizme (bakterije, protozoe, alge). S obzirom na to da se biokoloide mogu adsorbovati na površinu neorganskih čestica, čestice u vodama u prirodi često pokazuju heterogene osobine površine. Suspenzije nekih čestica, kao što su huminske i fulvinske kiseline, mogu reverzibilno agregirati usled tendencije koju imaju ka obrazovanju vodoničnih veza.

### **2.1.1.2. Električne osobine čestica**

Osnovna električna osobina finih čestica suspendovanih u vodi je površinsko naelektrisanje, koje doprinosi njihovoj relativnoj stabilnosti, utičući na to da čestice ostaju u suspenziji i ne agregiraju u toku dužeg vremenskog perioda. Suspenzije čestica su termodinamički nestabilne, i ukoliko se ostave dovoljno dugo vremena, koloidne i suspendovane čestice će flokulisati i taložiti se. Međutim, ovaj proces nije ekonomičan jer se odvija veoma sporo. Pregled uzroka koji dovode do stabilnosti čestica će doprineti boljem razumevanju tehnika koje se mogu primeniti za destabilizaciju čestica.

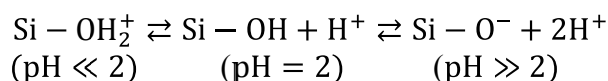
**Poreklo naelektrisanja površine čestica.** Većina čestica ima kompleksnu hemiju površine, pa naelektrisanje površine može nastati iz nekoliko razloga. Naelektrisanje površine nastaje na četiri osnovna načina:

- *Izomorfna zamena (kristalne nepravilnosti).* Pod određenim geološkim uslovima, metali u mineralima oksida metala mogu biti zamenjeni atomima metala niže valentnosti, što će dovesti do negativnog naelektrisanja kristalnog materijala.
- *Strukturne nepravilnosti.* U česticama gline i sličnim česticama minerala, nepravilnosti koje nastaju u toku formiranja kristala i pokidane veze na krajevima kristala mogu dovesti do pojave naelektrisanja površine.
- *Preferencijalna adsorpcija specifičnih jona.* Čestice adsorbuju prirodne organske materije (POM) (npr. fulvinske kiseline), a ovi makromolekuli standardno imaju



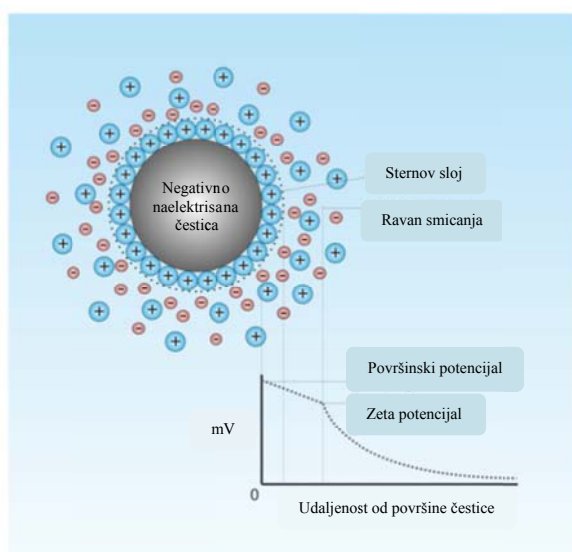
negativno naelektrisanje jer sadrže karboksilne grupe. Kao posledica toga, površina čestica koje su adsorbovale POM postaje negativno naelektrisana.

*Jonizacija funkcionalnih grupa na površini čestica.* Na površini mnogih minerala se nalaze funkcionalne grupe (npr. hidroksilne), pa naelektrisanje površine zavisi od pH vrednosti. Na primer, SiO<sub>2</sub> poseduje na svojoj spoljašnjoj površini hidroksilne grupe, koje mogu primiti ili donirati proton:



pH vrednost na kojoj je naelektrisanje površine čestice jednako nuli se definiše kao *tačka nultog naelektrisanja* (TNN). Na pH vrednostima iznad TNN, površina čestice će biti negativno naelektrisana, a pri uslovima pH ispod TNN, naelektrisanje površine čestice će biti pozitivno.

**Dvojni električni sloj.** U vodama u prirodi, negativno naelektrisane čestice okupljaju pozitivne jone (protivjone) na, i u blizini svoje površine, kako bi se na taj način postigla elektroneutralnost. Kao što je prikazano na Slici 1, sloj katjona će se čvrsto vezati na površinu negativno naelektrisane čestice i formirati fiksirani adsorbovani sloj. Ovaj sloj, debljine oko  $5 \cdot 10^{-10}$  m, je poznat kao *Helmholcov sloj* ili *Sternov sloj*. Iznad Helmholcovog sloja, neto negativno naelektrisanje i električno polje koji su prisutni privlače višak katjona i odbijaju anjone, od kojih ni jedni ni drugi nemaju fiksiran položaj. Ovi katjoni i anjoni se kreću pod uticajem difuzije (koja je posledica sudara sa molekulima rastvarača), a višak katjona se proteže od čestice ka rastvoru sve dok se naelektrisanje površine i električni potencijal ne eliminišu u potpunosti i ne postigne elektroneutralnost.



**Slika 1.** Šematski prikaz električnog dvojnog sloja oko čestice

Sloj katjona i anjona koji se proteže od Helmholcovog sloja u okolni rastvor se naziva *difuzni sloj* (Gaj-Čepmenov sloj). Zajedno, adsorbovani (Helmholcov) i difuzni sloj, čine *dvojni električni sloj*. U zavisnosti od osobina rastvora, debljina ovog sloja može biti do  $3 \cdot 10^{-8}$  m.

**Zeta potencijal.** Kada se naelektrisana čestica nađe u električnom polju između dve elektrode, negativno naelektrisana čestica će se kretati ka pozitivnoj elektrodi i obrnuto. Ovakvo kretanje se naziva *elektroforeza*. Treba naglasiti da kada se čestica kreće pod dejstvom električnog polja, određena količina vode koja se nalazi oko površine čestice se

kreće zajedno sa njom, usled čega se javlja sila smicanja (ravan smicanja). Standardno, stvarna ravan smicanja se nalazi u difuznom sloju, neposredno do teorijske (fiksne) ravni smicanja, definisane Helmholtcovim slojem (Slika 1). Električni potencijal koji se javlja između stvarne ravni smicanja i okolnog rastvora je veličina koja se određuje elektroforetskim merenjima. Ovaj potencijal se naziva *zeta potencijal*, i dat je izrazom:

$$Z = \frac{v^0 k_z \mu}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (1)$$

gde je:  $Z$  – zeta potencijal [V],

$v^0$  – elektroforetska pokretljivost [ $\mu\text{m/s}$ ]/[ $\text{V/cm}$ ] =  $v_E/E$ ,

$v_E$  – elektroforetska brzina čestice koja se kreće [ $\mu\text{m/s}$ ],

$E$  – jačina električnog polja koje deluje na česticu [ $\text{V/cm}$ ],

$k_z$  – konstanta koja iznosi  $4\pi$  ili  $6\pi$ ,

$\mu$  – dinamički viskozitet vode [ $\text{N}\cdot\text{s/m}^2$ ],

$\varepsilon$  – relativna permeabilnost u odnosu na vakuum (bezdimenziona veličina;  $\varepsilon$  za vodu iznosi 78,54), i

$\varepsilon_0$  – permeabilnost vakuuma ( $8,854188 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2/\text{J}$ ).

Empirijski, kad se apsolutna vrednost zeta potencijala smanji približno ispod 20 mV, dolazi do brze flokulacije. Zeta potencijal varira sa veličinom i oblikom čestice, njenim naelektrisanjem, jačinom električnog polja i prirodom jona u difuznom sloju. Većina prirodnih koloida u vodi ima zeta potencijal između -5 mV i -40 mV, zahvaljujući prisustvu najvećim delom karboksilnih ili hidrosilnih grupa. Zbog tih funkcionalnih grupa, zeta potencijal je pH zavisian. Sa snižavanjem pH, naelektrisanje na površini se smanjuje i približava se nuli. Kao što je ranije već spomenuto, pH vrednost na kojoj je zeta potencijal 0 se naziva tačka nultog naelektrisanja (TNN) ili izoelektrična tačka (IET), i važan je parametar za razumevanje prirode koloidne čestice. Kisele grupe, kao što su karboksilne, koje su odgovorne za veći deo naelektrisanja kod algi ili kod POM, disosuju pri višim vrednostima pH i zato imaju zeta potencijal koji ostaje prilično stabilan pri neutralnom pH ili u baznoj sredini. Suprotno od toga, oksidi su amfoterni, tako da koloidne gline imaju zeta potencijal koji se menja kako u kiseljoj, tako i u baznoj sredini. Feri-hidroksid je pozitivno naelektrisan u kiselim vodama, a negativno naelektrisan u baznim vodama.

### 2.1.1.3. Stabilnost čestica

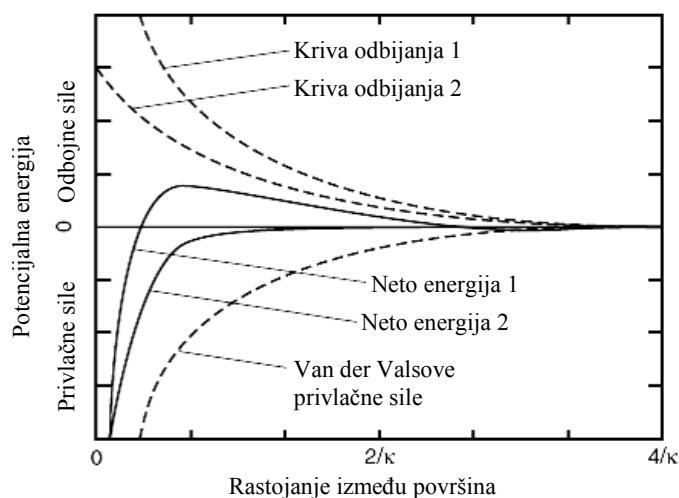
Stabilnost čestica u vodama u prirodi zavisi od ravnoteže između odbojnih elektrostatičkih sila i sila privlačenja (Van der Valsove sile).

**Odbojne elektrostatičke sile.** Osnovni mehanizam koji utiče na stabilnost hidrofobnih i hidrofilnih čestica je elektrostatičko odbijanje. Elektrostatičko odbijanje se, kao što je ranije navedeno, dešava usled toga što čestice u vodi imaju negativno (istoimeno) naelektrisanje površine. Jačina elektrostatičke sile odbijanja zavisi od naelektrisanja čestice i osobina rastvora.

**Van der Valsove privlačne sile.** Van der Valsove sile se javljaju kao posledica magnetske i elektronske rezonance, koja nastaje kada se dve čestice približe jedna drugoj. Ova rezonanca potiče od elektrona u atomima na površini čestice, usled čega se razvija jaka sila privlačenja između čestica onda kada se elektroni orjentišu tako da indukuju sinergistička električna i magnetna polja. Van der Valsove sile su proporcionalne polarizabilnosti površine čestice. Ove sile su dovoljno jake da prevaziđu elektrostatičko odbijanje, ali ipak ne mogu to

da postignu jer se sile elektrostatičkog odbijanja i električni dvojni sloj protežu dublje u rastvor nego što to čine Van der Valsove sile. Kao rezultat, javlja se energetska barijera koja mora biti prevaziđena da bi došlo do flokulacije, pa se u tom smislu dodaju koagulanti koji smanjuju sile odbijanja i time dovode do brze flokulacije.

**Interakcije čestica-čestica.** Interakcije čestica-čestica su izuzetno važne kada se želi razumeti agregacija. Teorija interakcije čestica-čestica (tzv. DLVO model – po naučnicima koji su predložili model: Derjaguin, Landau, Verwey i Overbeek) se zasniva na delovanju odbojnih i privlačnih sila na dve naelektrisane čestice kada se one približavaju jedna drugoj. Konceptualni dijagram DLVO modela interakcije između dve čestice sličnog naelektrisanja je prikazan na Slici 2.



**Slika 2.** Potencijalna energija privlačenja i odbijanja između dve čestice (Crittenden et al., 2012)

Kao što se sa Slike 2 vidi, dve osnovne sile koje deluju na čestice su sila odbijanja kao posledica naelektrisanja čestica i Van der Valsove sile privlačenja. Na Slici 2 su prikazana dva slučaja ponašanja čestica u zavisnosti od jačine odbojnih sila. U prvom slučaju, odbojne sile su takve da deluju duboko u rastvor u kome se čestice nalaze. U drugom slučaju, odbojne sile deluju na znatno manjem rastojanju. Ukupna neto energija, koja je na dijagramu prikazana punim linijama, predstavlja razliku između sila odbijanja i sila privlačenja. U prvom slučaju, sile privlačenja će prevladati na veoma malom ili veoma velikom rastojanju između čestica. Kriva ukupne neto energije za ovaj slučaj ima maksimum odbijanja koji mora biti prevaziđen da bi se čestice držale na okupu Van der Valsovih silama. Iako se u ovom slučaju flokule mogu formirati kada su čestice dosta udaljene, neto sila koja bi držala čestice povezanim je veoma slaba, i takve flokule se mogu lako pokidati. U drugom slučaju ne postoji energetska barijera koja se mora prevazići da bi čestice ostale na okupu. Iz ovoga je jasno da se, ukoliko se želi postići da koloidne čestice flokulišu, moraju smanjiti sile odbijanja, kao što je to u drugom slučaju na Slici 2. Dodatkom koagulanta koji smanjuje debljinu dvojnog električnog sloja, može doći do brze koagulacije/flokulacije.

#### 2.1.1.4. Kompresija dvojnog električnog sloja

U prethodnom tekstu je pokazano da će, ukoliko se smanji debljina dvojnog električnog sloja, čestice doći u kontakt usled Braunovog kretanja i ostati povezane usled dejstva Van der

Valsovih privlačnih sila. Kako se povećava jonska jačina rastvora, debljina dvojnog električnog sloja se smanjuje, što zauzvrat smanjuje zeta potencijal.

**Efekat jonske jačine rastvora.** Od mnogih faktora koji utiču na debljinu električnog dvojnog sloja, jonska jačina rastvora je verovatno najvažnija. Debljina električnog dvojnog sloja značajno opada sa povećanjem jonske jačine rastvora i valentnosti jona (Crittenden et al., 2012). Prema DLVO teoriji, Van der Valsove sile se protežu u rastvor oko  $10^{-6}$  mm, što znači da će, ukoliko je debljina dvojnog električnog sloja manja od toga, doći do brze flokulacije u suspenziji. Iako je moguće smanjiti debljinu dvojnog električnog sloja povećanjem jonske jačine rastvora, ovo nije praktičan način kojim se postiže destabilizacija čestica tokom obrade vode, jer je jonska jačina potrebna za postizanje tog efekta znatno veća od onih koje su prihvatljive u obrađenoj vodi (posebno u vodi za piće).

**Efekat protivjona.** Ukoliko se promeni naelektrisanje protivjona u rastvoru, smanjiće se debljina dvojnog električnog sloja (Crittenden et al., 2012). Koncentracija jona koja dovodi do smanjenja debljine dvojnog električnog sloja do tačke kada dolazi do flokulacije se definiše kao granična koagulaciona koncentracija (GKK), i zavisiće kako od vrste čestica, tako i od rastvorenih jona. Prema DLVO teoriji, GKK je obrnuto proporcionalna šestom stepenu naelektrisanja jona, odnosno, GKK vrednosti za jedno-, dvo- i trovalentne jone stoje u odnosu  $1 : \left(\frac{1}{2}\right)^6 : \left(\frac{1}{3}\right)^6$ , ili  $100\% : 1,6\% : 0,14\%$ , pod pretpostavkom da se elektroliti ne adsorbuju i ne precipituju. Ovaj odnos je poznat kao Šulc-Hardijevo pravilo. Stoga, ako 3000 mg/l NaCl dovodi do brze flokulacije hidrofobnih čestica, slične rezultate će postići 47 mg/l CaCl<sub>2</sub>. Takođe, treba napomenuti da će, ukoliko polivalentni joni sačinjavaju fiksni sloj (do negativno naelektrisane površine čestice), debljina električnog dvojnog sloja biti znatno manja, a GKK vrednost znatno niža od teorijski potrebne (prema Šulc-Hardijevom pravilu).

### 2.1.2. Teorija koagulacije

Kao što je već rečeno, koagulacija je proces kojim se čestice prisutne u vodi destabilizuju, tako da nakon toga mogu biti uklonjene nekom separacionom metodom. Mehanizmi kojima se tokom koagulacije postiže destabilizacija čestica su sledeći: 1) kompresija dvojnog električnog sloja, 2) adsorpcija i neutralizacija naelektrisanja, 3) adsorpcija i povezivanje čestica mostovima i 4) *sweep* koagulacija. S obzirom na to da kompresija dvojnog električnog sloja u obradi vode nema praktični značaj, ovaj mehanizam destabilizacije čestica neće dalje biti razmatran.

#### 2.1.2.1. Adsorpcija i neutralizacija naelektrisanja

Čestice mogu biti destabilizovane adsorpcijom njima suprotno naelektrisanih jona ili polimera. Većina čestica koje se nalaze u vodama u prirodi su negativno naelektrisane (čestice gline, huminske kiseline, bakterije) na pH vrednostima oko neutralne (pH 6 do 8), pa hidrolizovane soli metala, predhidrolizovane soli metala i katjonski organski polimeri mogu biti primenjeni za destabilizaciju čestica putem neutralizacije naelektrisanja. Katjonski organski polimeri mogu biti primenjeni i kao primarni koagulant, ali se ipak najčešće koriste kao pomoćni koagulant, zajedno sa neorganskim koagulantima, kako bi obrazovali mostove između čestica. Generalno, optimalna doza koagulant se postiže kada je površina čestice samo delimično pokrivena koagulantom (manje od 50%). Smatra se da polimeri velike gustine naelektrisanja i niske do srednje molekulske mase (10 000 – 100 000 Da) bivaju

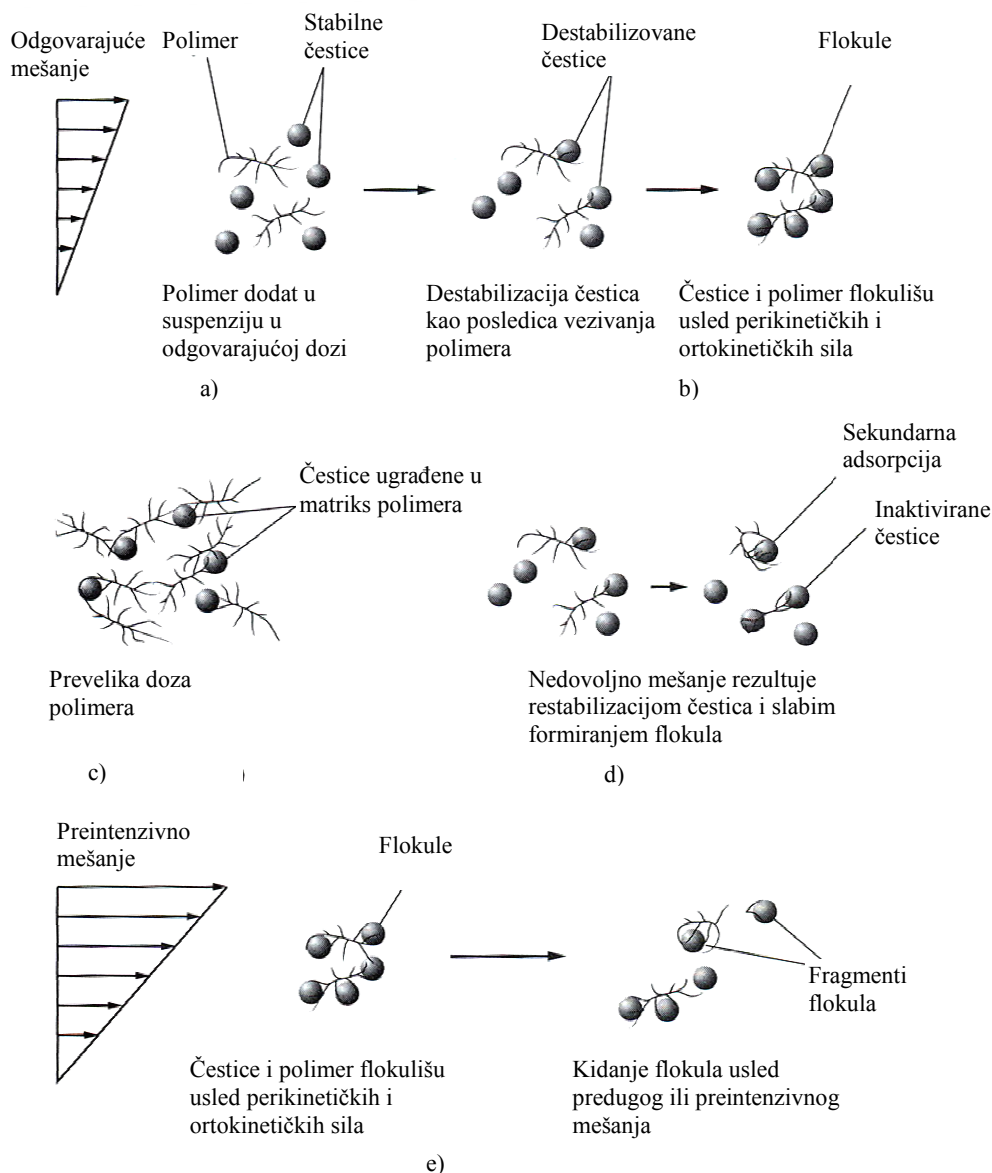
adsorbovani na negativno naelektrisanje čestice kao zakrpa i ne protežu se daleko od površine čestice u rastvor.

Kada je odgovarajuća količina polimera adsorbovana, naelektrisanje čestice je neutralisano, i ona će flokulisati. Ukoliko se doda previše polimera, čestice će poprimiti pozitivno naelektrisanje i ponovo će biti stabilizovane.

### ***2.1.2.2. Adsorpcija i obrazovanje mostova***

Obrazovanje mostova od strane polimera je kompleksan proces koji nije adekvatno opisan analitički. Šematski, lanci polimera bivaju adsorbovani na površinu čestica na jednom ili više mesta duž lanca polimera kao rezultat: 1) kulonovih (naelektrisanje-naelektrisanje) interakcija, 2) dipolnih interakcija, 3) vodoničnih veza i 4) Van der Valsovih privlačnih sila. Ostatak lanca polimera može ostati da slobodno visi u rastvoru, pa može biti adsorbovan na slobodna mesta na površini drugih čestica, i na taj način obrazovati mostove između čestica. Ukoliko slobodan (neadsorbovan) deo lanca polimera ne pronađe slobodna (nepopunjena) mesta na površini drugih čestica, neće doći do obrazovanja mostova. Stoga, postoji optimalan stepen pokrivenosti, odnosno adsorpcije polimera, pri kojoj će brzina agregacije biti maksimalna. Obrazovanje mostova od strane polimera je adsorpcioni fenomen, pa će optimalna doza koagulanta generalno biti proporcionalna koncentraciji prisutnih čestica. Adsorpcija i povezivanje čestica mostovima se odvija kod primene nejonskih polimera i polimera velike molekulske mase ( $10^5 - 10^7$  Da), a malog površinskog naelektrisanja.

**Mehanizmi reakcije polimera.** Šematski prikaz mehanizama reakcije polimera je dat na Slici 3. Pri optimalnoj dozi polimera, što je na slici prikazano pod a), čestice bivaju destabilizovane, pa nakon toga mogu flokulisati, b). Ukoliko je koncentracija čestica veoma niska, ili nije primenjeno dovoljno dobro mešanje, tada će se neadsorbovani krajevi polimera adsorbovati na destabilizovane čestice i dovesti do njihove restabilizacije (Slika 3d). Ukoliko se doda previše polimera, sva mesta za adsorpciju na površini čestica će biti zauzeta, pa čestice neće flokulisati (Slika 3c). Ukoliko se sistem meša previše dugo ili previše intenzivno, doći će do kidanja flokula (Slika 3e).



Slika 3. Šematski prikaz destabilizacije čestica polimerima po mehanizmu obrazovanja mostova (Crittenden et al., 2012)

### 2.1.2.3. Sweep koagulacija

Kada se primeni odgovarajuća doza, aluminijum i gvožđe formiraju nerastvorne precipitate, pa čestice bivaju uhvaćene u njih. Ovaj mehanizam destabilizacije se opisuje kao *sweep* koagulacija (flokulacija). Iako proces koji dovodi do *sweep* koagulacije nije jasno opisan, koraci prilikom dodatka nižih doza soli aluminijuma i gvožđa su sledeći: 1) hidroliza i polimerizacija jona metala, 2) adsorpcija proizvoda hidrolize na graničnu površinu i 3) neutralizacija naelektrisanja. Pri većim dozama, pretpostavlja se da se nukleacija precipitata odvija na površini čestica, dovodeći do rasta amornog precipitata, u okviru čije strukture su zarobljene čestice. Ovaj mehanizam je dominantan prilikom obrade vode kada se pH vrednost kreće između 6 i 8, a soli aluminijuma i gvožđa se primenjuju u koncentracijama koje prevazilaze saturaciju u odnosu na amorfni hidroksid metala koji se formira.

Interesantna činjenica vezana za *sweep* koagulaciju je ta da ovaj mehanizam generalno ne zavisi od vrste čestica, pa je ista doza koagulantna potrebna za formiranje *sweep* flokula bez obzira na vrstu čestica koje mogu biti prisutne (osim u slučaju POM). Iako doza koagulantna ne zavisi od vrste čestica, ona zavisi od pH vrednosti. *Sweep* koagulacijom se, generalno, postiže znatno bolje uklanjanje čestica nego kada su čestice destabilizovane samo putem neutralizacije naelektrisanja. Precipitati hidroksida pokazuju tendenciju da imaju prilično otvorenu strukturu, tako da čak i mala masa precipitata može dati veliku efektivnu zapreminu, i time veliku mogućnost za „hvatanje“ čestica. Povećanje doze koagulantna u oblasti u kojoj se odvija *sweep* koagulacija daje progresivno povećanje zapremine sedimenta, ali dalje povećanje iznad optimalne doze daje neznatno poboljšanje uklanjanja čestica.

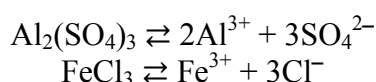
### 2.1.3. Vrste koagulanata/flokulanata

Izbor vrste i doze koagulantna zavisi od karakteristika koagulantna, vrste i koncentracije čestica koje se žele ukloniti, osobina i koncentracije POM i temperature i kvaliteta vode. Zasada, međuzavisnost ovih pet faktora je objašnjena samo kvalitativno, dok predviđanje optimalne kombinacije koagulanata u zavisnosti od karakteristika čestica i kvaliteta vode još uvek nije moguće.

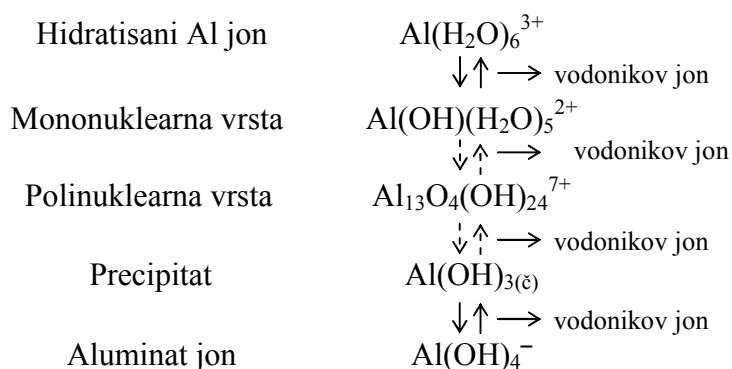
#### 2.1.3.1. Neorganski koagulantni na bazi metala

Osnovni neorganski koagulantni koji se primenjuju za obradu vode i otpadnih voda su soli aluminijuma i gvožđa i predhidrolizovane soli ovih metala. Ove soli su lako dostupne kao sulfati ili hloridi, u tečnoj ili čvrstoj formi.

**Reakcije soli aluminijuma i gvožđa.** Kada se joni gvožđa ili aluminijuma dodaju u vodu, odvija se niz paralelnih i uzastopnih reakcija. Inicijalno, kada se soli Al(III) i Fe(III) dodaju u vodu, one će disosovati dajući jone  $Al^{3+}$  i  $Fe^{3+}$ :

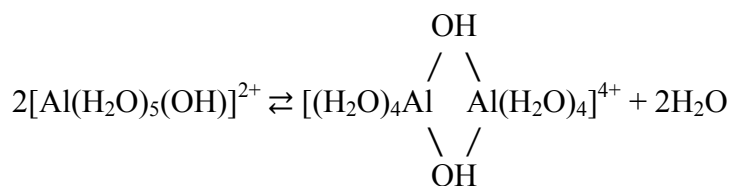


Nakon toga, joni  $Al^{3+}$  i  $Fe^{3+}$  hidratišu formirajući hidro-metalne komplekse  $Al(H_2O)_6^{3+}$  i  $Fe(H_2O)_6^{3+}$ . Ovi hidro-metalni kompleksi prolaze kroz niz hidrolitičkih reakcija koje vode formiranju različitih rastvorljivih mononuklearnih (jedan jon aluminijuma) i polinuklearnih (nekoliko jona aluminijuma) vrsta čestica:



Slika 4. Različiti proizvodi hidrolize aluminijuma

Slično aluminijumu, i gvožđe formira više različitih vrsta čestica. Polinuklearne vrste, kao što je npr.  $\text{Al}_{18}(\text{OH})_{20}^{4+}$ , se formiraju povezivanjem preko hidroksilnih mostova. Na primer, ovakvo povezivanje kada su prisutna dva atoma aluminijuma je:

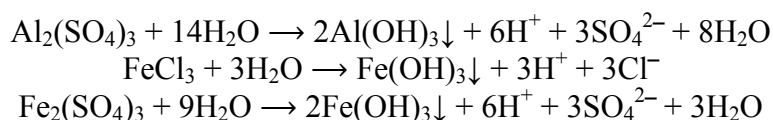


Treba napomenuti da sve ove mononuklearne i polinuklearne vrste mogu intereagovati sa česticama u vodi, u zavisnosti od karakteristika vode i broja čestica. Nažalost, teško je kontrolisati i znati koja mononuklearna ili polinuklearna vrsta je aktivna. Delovanje soli aluminijuma zavisi od načina kako obrazovane čestice reaguju sa rastvorenim ili koloidnim materijama u vodi. Na primer, destabilizacija sa monomernim česticama aluminijuma se odnosi:

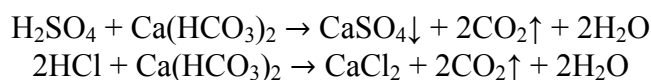
- na neutralizaciju naelektrisanja koloidnih i suspendovanih čestica,
- na neutralizaciju naelektrisanja i precipitaciju u slučaju prisustva rastvorenih organskih materija.

Koagulacija koloidnih materija u prisustvu taloga hidroksida aluminijuma se odnosi na *sweep* koagulaciju, kada se suspendovane i koloidne materije uklanjaju adsorpcijom na obrazovanim flokulama. Ove flokule ne menjaju naelektrisanje čestice u koloidnim ili kvazi-koloidnim sistemima. Između hidrolize koagulantata i nastajanja ovih velikih flokula je vrlo kratak vremenski period od nekoliko sekundi, kada se obrazuju u vodi rastvorni aluminijum i Fe(III)-hidrokso kompleksi, kao i solovi hidroksida metala, koji su takođe pozitivno naelektrisani. Svaki od ovih mehanizama ima svoje optimalne uslove odvijanja procesa.

Kada se aluminijum-sulfat, feri-hlorid ili feri-sulfat dodaju u vodu i formiraju precipitati hidroksida, sumarne reakcije su sledeće:



Nakon što se izdvoje talozi  $\text{Al}(\text{OH})_3$  ili  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , u vodi zaostaju ista jedinjenja kao kada bi u nju bile dodavane  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ili  $\text{HCl}$ , pa je dodavanje soli aluminijuma ili gvožđa ekvivalentno dodavanju jakih kiselina. Usled toga dolazi do snižavanja pH vrednosti i alkaliteta vode. Hidroksid aluminijuma je stabilan u opsegu pH 5,5 – 7,7, a hidroksid trovalentnog gvožđa u opsegu pH od 5 – 8,5. S obzirom da se radi o amfoternim solima, kada se odstupi od ovih pH vrednosti dolazi do rastvaranja hidroksida i pojave jona metala koji nisu dovoljno efikasni za izazivanje koagulacije, pa ostaju rastvoreni u vodi nakon obrade. Sa druge strane, pri hidrolizi soli aluminijuma i gvožđa u vodi, nastaju kiseline koje upravo teže da snize pH vode, usled čega može doći do rastvaranja hidroksida. Ukoliko voda ima dovoljno bikarbonatnih jona (dovoljan alkalitet) nastale kiseline će biti neutralisane prema reakcijama:



Dakle, pored stabilnih flokula hidroksida, nastaje i teško rastvoran kalcijum-sulfat, koji još pojačava efekat bistenja vode.



S obzirom na to da alkalitet predstavlja kapacitet vode za neutralizaciju kiselina, tj. deluje kao pufer koji sprečava promenu pH, promena pH koja prati dodatak ovih koagulanata će zavisiti od inicijalnog alkaliteta vode. Ukoliko prirodni alkalitet vode nije dovoljan da održi njenu pH vrednost, potrebno ga je povećavati spolja kako pH ne bi pala suviše nisko. Alkalitet vode se može povećavati dodatkom kaustične sode (NaOH), kreča ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) ili natrijum-karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). U većini postrojenja za obradu vode u ovu svrhu se primenjuje kaustična soda jer je jednostavna za rukovanje, a potrebna doza je relativno mala.

Proizvodi hidrolize aluminijuma i gvožđa mogu reagovati sa različitim ligandima prisutnim u vodi (npr.  $\text{SO}_4^{2-}$ , POM,  $\text{F}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) dajući i rastvorne i nerastvorne proizvode, što će uticati na potrebnu dozu koagulanta kojom se postiže željena destabilizacija čestica. Stoga, optimalna doza koagulanta veoma zavisi od hemijskih osobina vode i vrste čestica prisutnih u njoj.

Od neorganskih koagulanata na bazi metala najčešće se primenjuje aluminijum-sulfat, koji, ako se dozira u većim količinama, ima limitiran opseg pH vrednosti pri kojima se formira aluminijum-hidroksid. Ovo povećava sadržaj rastvorenih materija u vodi i može izazvati korozivne probleme.

S obzirom na kompleksnost reakcija koje prate dodatak soli aluminijuma i gvožđa, ne postoji teorija koja potpuno objašnjava dejstvo ovih koagulanata, a takođe postoje još neke nepoznanice vezano za prirodu aktivnih vrsta, ulogu drugih prisutnih soli, posebno anjona, i za prirodu formiranih agregata, pa nije moguće unapred predvideti performanse procesa koagulacije. U svrhu skrininga koagulacionih performansi izabranog koagulanta u određenoj vodi, prethodno se izvode džar testovi.

**Značaj inicijalnog mešanja.** Brzo inicijalno mešanje prilikom obrade vode dodatkom soli metala je od izuzetne važnosti. Uzastopne reakcije prikazane na Slici 4 se odvijaju veoma brzo. Na primer, na pH 4, polovina jona  $\text{Al}^{3+}$  hidrolizuje do  $\text{Al(OH)}^{2+}$  u toku  $10^{-5}$  s. Stoga je jasno da je trenutno brzo i intenzivno mešanje nužno, posebno onda kada se soli metala koriste kao koagulanti koji treba da smanje površinsko naelektrisanje koloidnih čestica.

### **2.1.3.2. Predhidrolizovane soli metala**

Iz prethodnog razmatranja o primeni soli aluminijuma i gvožđa, jasno je da je teško kontrolisati obrazovanje različitih reakcionih vrsta, posebno pri niskim dozama. Ova nepredvidljivost povezana sa solima aluminijuma i gvožđa je dovela do razvoja predhidrolizovanih (delimično neutralisanih) soli metala. Predhidrolizovane soli metala se dobijaju u reakciji aluminijuma ili gvožđa sa različitim solima (npr. hloridima, sulfatima), vodom i hidroksidom u kontrolisanim uslovima mešanja. Što se tiče predhidrolizovanih soli aluminijuma, one imaju nekoliko prednosti u odnosu na klasične soli aluminijuma: 1) potrebne su manje doze za efikasnu koagulaciju (na bazi  $\text{Al}^{3+}$ ), u slučajevima kada POM ne diktiraju dozu koagulanta u neutralnim ili blago kiselim uslovima sredine, 2) formiraju se jače flokule veće gustine (mada su pomoćni flokulanti još uvek neophodni u mnogim slučajevima), 3) nastaju manje zapremine mulja, 4) manje utiču na pH vode, i 5) dejstvo predhidrolizovanih soli aluminijuma je manje zavisno od temperature u poređenju sa nemodifikovanim solima aluminijuma.

Komercijalne predhidrolizovane soli aluminijuma, koje se uobičajeno obeležavaju sa PACl, imaju sledeću opštu formulu:  $\text{Al}_a(\text{OH})_b(\text{Cl})_c(\text{SO}_4)_d$ . Iako sve formulacije ne sadrže sulfat, prisustvo sulfatnih jona pomaže stabilizaciju polimera aluminijuma i sprečava njihovu precipitaciju. Ovi polimeri su efikasniji od onih koji se formiraju prostim dodavanjem soli

aluminijuma u rastvor jer veći katjonski polimeri mogu biti formirani povećanjem udela hidroksida prema aluminijumu ( $R=OH/Al$ ), što vodi poboljšanoj neutralizaciji naelektrisanja. Druga prednost je ta što polimer, što je veći, to je više kristalan, kompaktan i ima veću gustinu. S druge strane, kako se vrednost  $R$  povećava, polimeri postaju manje stabilni, i mogu početi da precipituju, što stvara problem kod njihovog skladištenja.

Kao što je u ranijem tekstu prikazano, kada soli aluminijuma i gvožđa hidrolizuju, oslobađaju se vodonikovi joni, koji će reagovati sa alkalitetom vode. U formulaciji PACl koagulanata, jedan deo vodonikovih jona koji se oslobode se neutrališe bazom ( $OH^-$ ) u toku proizvodnje koagulanta. Stepen do kog su vodonikovi joni koji se oslobađaju hidrolizom predneutralisani se naziva baznost proizvoda.

Kada se govori o koagulantima na bazi metala i napred opisanim mehanizmima koagulacije, mogu se definisati četiri zone doza koagulanta, kojima se postižu sledeći efekti na negativno naelektrisane čestice (Duan and Gregory, 2003):

- zona 1: veoma niska doza koagulanta  $\Rightarrow$  čestice su još uvek negativno naelektrisane, te stoga stabilne,
- zona 2: doza koagulanta dovoljna da dovede do neutralizacije naelektrisanja  $\Rightarrow$  koagulacija,
- zona 3: više doze koagulanta  $\Rightarrow$  neutralizacija naelektrisanja i restabilizacija, i
- zona 4: još više doze koagulanta  $\Rightarrow$  izdvajanje taloga hidroksida i *sweep* koagulacija.

### 2.1.3.3. Organski polimeri

Organski polimeri su molekuli dugih lanaca koji se sastoje od hemijskih podjedinica koje se ponavljaju. Ove podjedinice obično imaju funkcionalne grupe koje mogu da disosuju, i koje daju naelektrisanje molekulu polimera. Iz tog razloga, organski polimeri se često nazivaju i polielektroliti. Organski polimeri se, generalno, ne koriste kao primarni koagulanti, već se češće primenjuju kada su čestice već destabilizovane u određenoj meri dodatkom koagulanta na bazi metala. Polimeri se prema svom poreklu dele na prirodne i sintetske, a prema naelektrisanju na katjonske (sa pozitivnim naelektrisanjem), koji se mogu koristiti i kao koagulanti i kao flokulanti, anjonske (sa negativnim naelektrisanjem) i nejonske (sa jednakim brojem pozitivno i negativno naelektrisanih grupa), koji se koriste samo kao flokulanti.

**Sintetski organski polimeri.** Uopšteno, sintetski organski polimeri su znatno jeftiniji od onih koji se dobijaju iz prirodnih izvora, pa se stoga češće primenjuju u obradi vode i otpadnih voda. Sintetski organski polimeri se dobijaju ili homopolimerizacijom jednog monomera, ili kopolimerizacijom dva monomera. Tokom sinteze polimera može se uticati na njihovu veličinu (molekulsku masu), prisustvo različitih naelektrisanih grupa, na broj naelektrisanih grupa duž lanca polimera (gustina naelektrisanja) i na strukturu (da li će biti linearni ili razgranati).

U poređenju sa aluminijumom kao koagulantom, polimeri imaju sledeće prednosti:

- potrebne su niže doze koagulanta,
- manja zapremina mulja,
- niže povećanje sadržaja jona u tretiranoj vodi,
- niži sadržaj aluminijuma u obrađenoj vodi, i
- niži troškovi za 25 – 30% (Bolto and Gregory, 2007).

Polimeri su posebno efikasni u prevazilaženju problema flokula koje se sporo talože, a koje se javljaju prilikom izvođenja koagulacije na niskim temperaturama i u mekim obojenim vodama. Kapacitet postrojenja za obradu vode se može udvostručiti sa obrazovanjem većih i jačih flokula, brzina razdvajanja tečne i čvrste faze se može značajno povećati, a primena ostalih hemikalija smanjiti. Naravno, primena polimera ima i svoje nedostatke – u određenim slučajevima troškovi su veći, a negativan uticaj na okruženje značajan, potrebna je veća pažnja prilikom doziranja (veća osetljivost na neodgovarajuću dozu), slabija je efikasnost uklanjanja mutnoće i POM u nekim slučajevima.

Katjonski organski polimeri koji se primenjuju u obradi vode se uopšteno proizvode tako da su rastvorni u vodi, da se adsorbuju ili reaguju brzo sa česticama prisutnim u vodi i da poseduju hemijsku strukturu koja odgovara datoj nameni. Kada se primenjuju kao primarni koagulant, katjonski polimeri, za razliku od jona aluminijuma i gvožđa, ne proizvode flokule velike zapremine, jer organski koagulant mogu biti efikasni pri mnogo nižim dozama od neorganskih koagulanata. Međutim, mulj koji nastaje primenom organskih koagulanata je često veće gustine i više lepljiv od mulja nastalog primenom neorganskih koagulanata, pa katjonski organski koagulant nisu pogodni za svaki vid procesa separacije koji sledi nakon koagulacije.

Treba napomenuti da se, s obzirom na to da ne daju uvek vodu jednakog kvaliteta kao koagulant na bazi metala, organski koagulant retko primenjuju samostalno (osim kada voda u koju je dodat koagulant ide direktno na filtraciju). Takođe, ukoliko se organski polimeri koriste samostalno, neefikasni su u uklanjanju rastvorenih materija (npr. POM, As, F). Uobičajena je primena katjonskih organskih polimera u kombinaciji sa koagulantima na bazi metala. Osnovna prednost ovakve kombinovane primene je smanjenje potrebne doze koagulant na bazi metala za 40 – 80%. Niža primenjena doza koagulant na bazi metala smanjuje količinu nastalog mulja i potrošnju alkaliteta vode, odnosno smanjenje pH vrednosti tretirane vode.

Usled kompleksnih interakcija između polimera i čestica, i uticaja kvaliteta vode na te interakcije, izbor polimera za tretman neke vode se zasniva na empirijskim informacijama. Uslovi koji vladaju u vodi će takođe uticati na potrebnu dozu polimera. Ukoliko gustina naelektrisanja polimera zavisi od pH vrednosti, onda će i optimalna doza polimera varirati sa pH, i uopšteno će opadati sa smanjenjem pH. Što se tiče jonske jačine i vrste prisutnih jona, oni ne utiču značajnije na potrebnu dozu polimera.

Uspešna primena polimera u obradi vode zahteva adekvatno dispergovanje polimera, kako bi se potpomogla njegova uniformna adsorpcija.

#### **2.1.4. Teorija flokulacije**

Efekat flokulacije zavisi od karakteristika čestica, kao i uslova mešanja u sistemu. Dodatkom koagulant, čestice prisutne u vodi bivaju destabilizovane i počinju flokulisati. Šematski prikaz ovog procesa je dat na Slici 5.



Slika 5. Šematski prikaz obrazovanja flokula (Crittenden et al., 2012)

#### 2.1.4.1. Mikroflokulacija (perikinetička flokulacija)

Brzina flokulacije malih čestica je zavisna od brzine kojom čestice difunduju jedne prema drugima. Stoga je za male čestice (manje od  $0,1 \mu\text{m}$ ) primarni mehanizam agregacije Braunovo kretanje, ili *mikroflokulacija*. Mikroflokulacija je takođe poznata i kao *perikinetička flokulacija*. Kako odmiče agregacija malih čestica, tako nastaju sve krupnije čestice. Nakon kratkog vremena (nekoliko sekundi), formiraju se mikroflokule čija se veličina kreće u opsegu od  $1 - 100 \mu\text{m}$ .

#### 2.1.4.2. Makroflokulacija (ortokinetička flokulacija)

Osnovni način kojim se postiže flokulacija čestica većih od  $1 \mu\text{m}$  u vodi je blago mešanje vode. Ovakvim mešanjem se uspostavlja gradijent brzine koji povećava verovatnoću sudara suspendovanih čestica, što je poznato kao *makroflokulacija* ili *ortokinetička flokulacija*. Međutim, u toku procesa mešanja tokom makroflokulacije, flokule su izložene sili smicanja, što dovodi do erozije i kidanja nekih od agregata. Nakon nekog perioda mešanja dostiže se ravnotežno stanje u smislu raspodele veličina flokula, pa je kidanje flokula i obrazovanje novih približno ujednačeno. Brzina kojom se dostiže ravnotežno stanje, kao i tip raspodele veličina flokula zavise od hidrodinamičkih uslova u sistemu, kao i od hemije interakcije koagulant – čestice.

#### 2.1.4.3. Diferencijalno taloženje

Agregacija i rast flokula može nastati usled taloženja čestica različitim brzinama. Kada nastanu dovoljno velike čestice, one počinju da se talože pod dejstvom gravitacione sile. Razlike u brzinama taloženja dovode do toga da se čestice različitih veličina i/ili gustina sudaraju i flokulišu. Stoga se diferencijalno taloženje čestica odvija u heterogenim suspenzijama (koje sadrže čestice različitih veličina) tokom sedimentacije, i predstavlja dodatni mehanizam za potpomaganje flokulacije. U suspenzijama koje sadrže čestice čije se veličine kreću u širokom opsegu, diferencijalna sedimentacija kao mehanizam može imati značajan udeo u flokulaciji.

## 2.1.5. Faktori koji utiču na koagulaciju i flokulaciju

### 2.1.5.1. Temperatura

Temperatura utiče na rastvorljivost proizvoda koagulacije i flokulacije, pa je sa te strane bolji rad na nižim temperaturama. Sa druge strane, na nižim temperaturama flokule se formiraju sporije i manje su gustine, što nije poželjno. Takođe, niža temperatura vode povećava njen viskozitet, usporava hidrolizu i flokulaciju čestica. U tom smislu se mogu očekivati eventualni problemi kod izvođenja koagulacije i flokulacije u letnjem i zimskom periodu godine, kada temperatura vode, posebno površinske, može značajnije varirati.

Poznato je da koagulant na bazi metala imaju slabije performanse na niskim temperaturama. Variranje temperature može izazvati fizičke i hemijske promene. Fizički posmatrano, temperatura vode može preko viskoziteta uticati na transport čestica i proces sudaranja čestica. Hemijske promene usled varijacije temperature vode su povezane sa reakcijama hidrolize, precipitacijom i rastvorljivošću hidroksida metala.

### 2.1.5.2. Mešanje

Mešanje ima gotovo odlučujući uticaj za odvijanje dobre koagulacije u slučaju primene koagulant u režimu adsorpciono destabilizujućeg mehanizma koagulacije. U tom slučaju, u cilju dobre raspodele koagulant u vodi, mešanje treba da je intenzivno i kratkotrajno. Sa druge strane, mehanizam *sweep* koagulacije, koja je uslovljena nastajanjem precipitata hidroksida aluminijuma i uklapanjem koloida u njega, je znatno sporiji proces, tako da kod *sweep* koagulacije vreme i intenzitet mešanja nisu od tolike važnosti. Generalno, kada se koagulant/flokulant doda u vodu, potrebno je da se postigne njegova ravnomerna raspodela u celoj zapremini. Važno je ovaj korak izvesti brzo, jer se u suprotnom, u slučaju primene koagulanata na bazi soli metala, velikom brzinom odvijaju uzastopne reakcije prikazane na Slici 4, a u slučaju primene polimera, lokalno se javljaju njihove povećane koncentracije, što dovodi do neuniformne adsorpcije, pa može doći do restabilizacije nekih čestica usled adsorbovanja veće količine polimera na njihovoj površini od optimalne. U praksi, ovo početno brzo mešanje može imati značajan uticaj na efikasnost bistrenja. Nakon kratkotrajnog brzog mešanja prelazi se na produženo sporije mešanje, koje treba da obezbedi da prethodno destabilizovane čestice dođu u kontakt i obrazuju flokule. S obzirom na to da su flokule manje ili više osetljive na silu smicanja, mešanje u ovom koraku ne sme biti previše intenzivno (Slika 3).

### 2.1.5.3. pH

Kod voda sa niskim alkalitetom, dodatak koagulant može toliko sniziti pH vode, da se ne može sprovesti koagulacija. Kod voda sa visokim alkalitetom potrebno je dodati veću dozu koagulant da bi rezultujući pH bio u opsegu optimalnog za dati koagulant. pH je važan parametar koagulacije jer:

- utiče na površinsko naelektrisanje koloida,
- utiče na naelektrisanje funkcionalnih grupa POM,
- utiče na naelektrisanje čestica koagulant,
- utiče na površinsko naelektrisanje flokula, i
- utiče na rastvorljivost koagulant.

#### 2.1.5.4. Prisustvo POM

U prisustvu POM potrebno je dodati odgovarajuću dozu koagulant koji neutrališe njihovo naelektrisanje. Kod svih koagulanata smanjenje efekta uklanjanja POM je manje pri višim pH vrednostima.

#### 2.1.5.5. Mutnoća

U slučaju veće mutnoće sirove vode, potrebne su i veće doze koagulant, ali ta zavisnost nije linearna.

#### 2.1.6. Simulacija procesa koagulacije/flokulacije

Da bi se mogli sagledati uticaji svih faktora koji su od značaja za proces koagulacije i flokulacije, ovi procesi se simuliraju u laboratorijskim uslovima na džar testeru. Voda koja se tretira se razlije u čaše koje se postavljaju u uređaj (Slika 6), i u njih se dodaju koagulanti i flokulanti u različitoj kombinaciji, različitoj količini, na različitom pH, pri različitim uslovima mešanja. Prati se vreme nastajanja flokula, njihov broj, veličina, izgled, a nakon završenog mešanja prati se brzina i efikasnost taloženja formiranih flokula. Nakon određenog vremena taloženja, proverava se efikasnost koagulant i/ili flokulant u datim uslovima primene, tako što se u izbistrenom delu vode meri mutnoća, ili sadržaj organskih materija nekom pogodnom metodom (TOC, DOC,  $UV_{254}$  i dr.). Količina koagulacionog/flokulacionog sredstva pri kojoj je obrazovanje flokula najbrže uz najbolje bistrenje vode, približno predstavlja količinu koju je potrebno dozirati u realnim pogonskim uslovima (u praksi se ova količina ipak mora empirijski korigovati – obično smanjiti – jer se džar testovi izvode u stacionarnim uslovima, u kojima nema efekta već obrazovanih flokula, a koji postoji u realnim pogonskim uslovima). Pored toga, u vodi se proverava pH nakon koagulacije, i da li su, i u kojoj količini, u njoj zaostali primenjeni koagulanti i/ili flokulanti.



Slika 6. Džar tester

## 2.2. PREDNOSTI I NEDOSTACI TRADICIONALNIH KOAGULANATA I FLOKULANATA

Najvažnije prednosti tradicionalnih koagulanata/flokulanata jesu njihova velika efikasnost i pouzdanost, kao i mala cena. Ipak, pored toga, ovi koagulanti/flokulanti imaju i niz nedostataka. Jedan od najvažnijih nedostataka je svakako njihova toksičnost i negativan uticaj na živi svet, pa će u narednom tekstu biti nešto više reči o tome.

Sa prosečnom koncentracijom od oko 8%, aluminijum je treći najprisutniji element u Zemljinoj kori, i najprisutniji među metalima. Može biti prirodno prisutan u vodi, gde dospeva rastvaranjem iz zemljišta i stena. Takođe, može biti prisutan i kao ostatak nakon primene jedinjenja aluminijuma koja se široko primenjuju kao tradicionalni koagulanti i/ili flokulanti u obradi vode. U vodi za piće je prisutan u formama niske molekulske mase.

Mogućnost da izlaganje aluminijumu može biti etiološki faktor nastanka Alchajmerove bolesti je poznata još od 1965. godine, kada je ispitivana neurofibrilarna degeneracija centralnog nervnog sistema zečeva koji su bili izloženi solima aluminijuma (Nieboer et al., 1995; Flaten, 2001). Alchajmerova bolest je najčešći oblik demencije, koja je uopšteni termin za gubitak memorije i drugih intelektualnih sposobnosti (npr. dezorijentacija, konfuzija, problemi sa izražavanjem misli i dr.), i koja je dovoljno ozbiljna da ometa svakodnevni normalan život. Nakon toga, nekoliko studija je izvedeno sa ciljem utvrđivanja veze između aluminijuma i Alchajmerove bolesti (Crapper et al., 1973; Martyn et al., 1989; Doll, 1993; Nieboer et al., 1995; McLachlan, 1995; Savory et al., 1996; Becaria et al., 2006; Walton and Wang, 2009; Bondy, 2010). Dodatno, pre više od 100 godina izvedeni su eksperimenti na životinjama koji su ukazali na aluminijum kao potencijalni neurotoksikant (Flaten, 2001). Takođe, otkriveno je da pacijenti kojima se izvodi dijaliza obolevaju od demencije kada fluid za dijalizu sadrži visoku koncentraciju aluminijuma (Crapper et al., 1973; Davidson et al., 1982; Alfrey, 1993a; Alfrey, 1993b). Iako postoje značajni dokazi da aluminijum može imati ulogu u etiologiji ili patogenezi Alchajmerove bolesti, ova povezanost je još uvek otvorena za debatu (Flaten, 2001). Postoje takođe dokazi da izlaganje aluminijumu može inicirati pojavu Parkinsonove bolesti (Bondy, 2010).

Da bi aluminijum uticao na zdravlje, on treba da bude apsorbovan u organizam. Međutim, on se veoma slabo apsorbuje u gastrointestinalnom traktu, ali se ne može zanemariti mogućnost da neke frakcije aluminijuma u vodi za piće mogu biti posebno biodostupne (aluminijum koji može biti solubilizovan želudačnom kiselinom) (Flaten, 2001).

Što se tiče jedinjenja gvožđa, generalno postoji nedostatak informacija o njihovoj potencijalnoj toksičnosti. Smatra se da soli gvožđa imaju malu akutnu toksičnost zbog njihove brze oksidacije do nerastvornih oblika (Sotero-Santos et al., 2007). Zapravo, feri-hlorid ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) se širom sveta koristi kao aditiv modifikovanom mleku u prahu, i kao hemostatik ili lek za hipohromnu anemiju (Sato et al., 1992). Međutim, jedinjenja gvožđa mogu imati ozbiljniji uticaj na zdravlje od samog gvožđa, koje je relativno neškodljivo. Na primer, u vodi rastvorna gvožđe (II)-jedinjenja, kao što je fero-hlorid i fero-sulfat, mogu izazvati toksični efekat u koncentracijama većim od 200 mg, i imaju letalni efekat na odrasle osobe u dozama većim od 10 – 50 g. Samo gvožđe je za čoveka esencijalni mikroelement, koji ima ulogu u rastu, razvoju i preživljavanju u dužem periodu (Chandrasekaran et al., 2010). Zapravo, apsorpcija i distribucija gvožđa se uobičajeno homeostatski reguliše, kako bi se smanjio rizik od nedostatka ili prevelike količine (Anderson, 2007).

Uprkos njegovom značaju, smatra se da su koncentracije gvožđa veće od 200 mg/dan toksične za ljudski organizam. Epidemiološka i klinička ispitivanja su pokazala da je povećan sadržaj gvožđa u organizmu povezan sa povećanim rizikom od raka, vaskularnih oboljenja i neuroloških poremećaja (Weinberg, 1984; Stevens et al., 1988; Sato et al., 1992; Berg et al., 2001; Siah et al., 2005; Chandrasekaran et al., 2010). Takođe, utvrđeno je da izlaganje feri-hloridu značajno uvećava broj aberacija i oštećenja hromozoma ljudskih limfocita (Poddar et al., 2004).

U slučaju raka, smatra se da gvožđe katalizuje formiranje visoko reaktivnih vrsta (npr. hidroksilnih radikala ili reaktivnih gvožđe-kiseonik kompleksa) od superoksidnih anjona i vodonik-peroksida, koji mogu reagovati sa hromozomima, oštetiti DNK i rezultovati

kancerogenezom (Aust et al., 1985; Cerruti, 1985; Halliwell and Gutteridge, 1988). Dodatno, poznato je da gvožđe ima glavnu ulogu u inicijaciji i propagaciji enzimske reakcije peroksidacije lipida (Minotti and Aust, 1987; Chandrasekaran et al., 2010). Skorašnja ispitivanja su takođe pokrenula jedno važno pitanje vezano za zdravlje – Chandrasekaran i sar. (2010) su utvrdili da arsen i gvožđe sinergistički povećavaju stepen peroksidacije masti u jetri.

Iako imaju dobru efikasnost, problem sa sintetskim polimerima je njihova toksičnost, koja je posledica prisustva neproreagovalih monomera (kao što su akrilamid, dialilmetilamonijum hlorid), neproreagovalih hemikalija korišćenih za proizvodnju monomernih jedinica (kao što je epihlorohidrin i formaldehid) i nus-proizvoda reakcije polimera u vodi (kao što je formiranje N-nitrozodimetilamina). U eksperimentima na životinjama, akrilamid se pokazao kao kancerogen, posebno delujući na štitnu, mlečne i nadbubrežne žlezde, mošnice i usnu duplju, a pored toga je utvrđeno da pokazuje jako neurotoksično dejstvo na majmune, mačke, pacove i dr. (Chico Galdo et al., 2006; Zahrim et al., 2011). Akrilamid je i veoma potentan prekursor za formiranje nus-proizvoda prilikom dezinfekcije hlorom, pa se njegov sadržaj mora strogo kontrolisati. N-nitrozodimetilamin je poznati animalni kancerogen, sa 1000 puta većom potencijom od trihalometana.

Anjonski i nejonski polimeri koji se uobičajeno koriste su generalno male toksičnosti, dok su katjonski polimeri više toksični, posebno kada se govori o akvatičnim organizmima. Zabrinutost vezana za ove kontaminante je dovela do toga da se u Japanu i Švajcarskoj zabrani upotreba polielektrolita u procesima pripreme vode za piće, dok su Nemačka i Francuska postavile veoma stroga ograničenja u tom smislu. Monomeri su toksičniji od samih polimera, i njihov sadržaj se strogo kontroliše, posebno kada se radi o proizvodima na bazi akrilamida. Za katjonske polimere se smatra da imaju srednju do visoku toksičnost, i mnogo su više toksični za akvatične organizme od anjonskih i nejonskih polimera (Hamilton et al., 1994). Katjonski polimeri su štetni za ribe zbog mehaničkog blokiranja škrga, što dovodi do njihovog gušenja. Ribe su osetljivije na katjonske polimere, dok su alge osetljivije na anjonske.

Pored toga što su toksični, problem sa tradicionalnim koagulantima je i to što su slabo biodegradabilni. Većina sintetskih polimera je otporna na biodegradaciju, koja, ako se i odvija, teče veoma sporo.

Mulj koji zaostane nakon koagulacije i flokulacije se ne može koristiti kao dodatak đubrivu ili stočnoj hrani jer sadrži ostatke koagulanata i flokulanata koji su potencijalno opasni po zdravlje. Pored toga, talozi aluminijuma su želatinozni, kiseli i teško se obezvodnjavaju, što stvara probleme kod njihovog odlaganja (Ndabigengesere and Narasiah, 1998a). Biološka obrada ovog mulja bi takođe mogla biti problematična, jer ostaci koagulanata i flokulanata mogu ometati ovaj proces. Smanjenje pH vrednosti obrađene vode i povećanje njene provodljivosti, kao i mala efikasnost na niskim temperaturama su dodatni nedostaci aluminijuma kao koagulanta (Ndabigengesere and Narasiah, 1998a).

### 2.3. PRIRODNI KOAGULANTI

Poslednjih godina se sprovode intenzivna ispitivanja prirodnih koagulanata sa ciljem da oni delimično ili u potpunosti zamene hemijske koagulate u obradi vode i otpadnih voda. Prirodni koagulanti se mogu dobiti iz biljaka, životinja i mikroorganizama. Smatra se da oni nisu štetni po zdravlje, a pored toga, mulj koji se dobije nakon obrade vode je biodegradabilan, pa se može, u zavisnosti od sastava vode koja se tretira, biološki obrađivati i odlagati u okruženje bez štetnog uticaja. U poređenju sa hemijskim koagulantima, prirodni

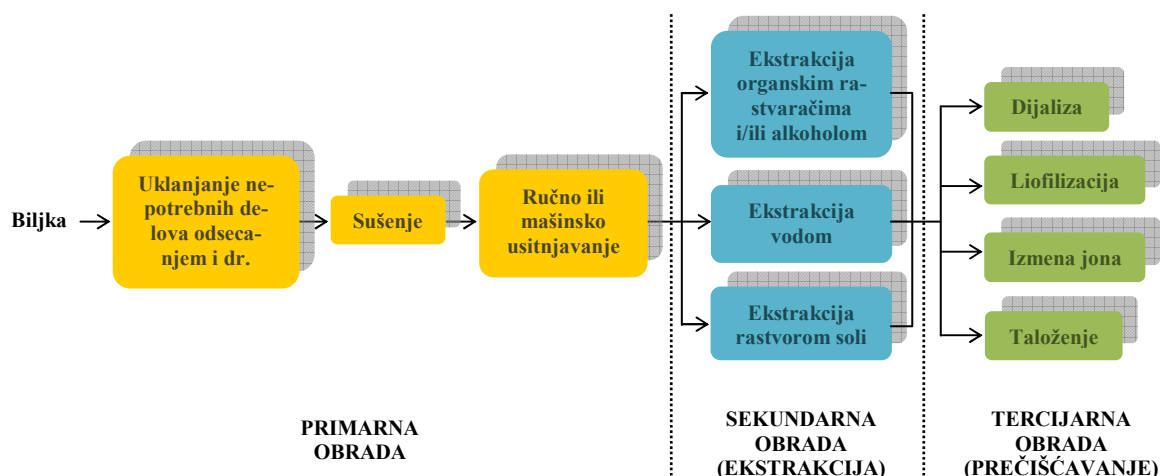


koagulanti su relativno ekonomični za zemlje u razvoju (jer su tradicionalni koagulanti u ovim zemljama skupi), i mogu se lako pripremiti za upotrebu (Yin, 2010). Takođe, u poređenju sa aluminijumom, prirodni koagulanti (npr. oni dobijeni iz *Moringa oleifera*-e) generišu do 6 puta manju zapreminu taloga (Ndabigengesere and Narasiah, 1998b; Narasiah et al., 2002; Bhuptawat et al., 2007), a posle obrade ne menjaju značajno pH vrednost vode, kao što je to slučaj kod primene soli aluminijuma. U doba kada smo svi svesni brzih klimatskih promena, iscrpljivanja prirodnih resursa planete i generalno degradacije životne sredine, primena prirodnih koagulanata, koji se dobijaju iz obnovljivih izvora, netoksični su i biodegradabilni, predstavlja značajan progres u globalnom razvoju održivih tehnologija. S obzirom na temu ovog rada i na to da koagulanti koji potiču iz biljnog materijala imaju najveći potencijal za masovnu proizvodnju, u ovom delu će biti dat pregled samo onih rezultata dosadašnjih istraživanja koji su vezani za prirodne koagulanate dobijene iz biljaka.

Ideja o primeni prirodnih koagulanata za bistrenje vode datira mnogo vekova unazad. Postoje pisani dokumenti iz Indije u kojima se pominje da je seme nirmali drveta (*Strychnos potatorum*) korišćeno za bistrenje vode (Sutherland, 2012). U XVI i XVII veku, vojnici Perua su u te svrhe koristili pečena i samlevena zrna kukuruza (*Zea mays*). Do sada su u svrhu dobijanja koagulanata ispitivane razne biljke: *Moringa oleifera*, *Strychnos potatorum* (Adinolfi et al., 1994), žir (Özacar and Şengil, 2000), kaktusi iz roda *Opuntia* (Young et al., 2005; Miller et al., 2008), semenke grožđa (Jeon et al., 2009), *Jatropha curcas* (Pritchard et al., 2009), krompir (Omar et al., 2008), *Prosopis juliflora* (Diaz et al., 1999), različite vrste kestena i žira (Šćiban et al., 2009), *Cassia angustifolia* (Sanghi et al., 2002), *Cactus latifaria* (Diaz et al., 1999) i druge. U skorije vreme, najviše ispitivana biljka u smislu dobijanja prirodnih koagulanata je *Moringa oleifera*. Rezultati ovih istraživanja su potvrdili da je ekstrakt dobijen iz semena *M. oleifera*-e veoma efikasan kao koagulant u obradi vode (Okuda et al., 2001b; Folkard and Sutherland, 2002; Ghebremichael et al., 2009; Nkurunziza et al., 2009; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2009a; Pritchard et al., 2010a).

Prema podacima dostupnim u literaturi, jedinjenja iz biljnog materijala koja poseduju koagulacionu aktivnost mogu biti proteini (Ndabigengesere et al., 1995; Ghebremichael et al., 2005, 2006; Yin, 2010), polisaharidi (Adinolfi et al., 1994; Miller et al., 2008; Yin, 2010), tanini (Özacar and Şengil, 2000), što su sve polarne komponente, ali ima i rezultata koji ukazuju na bitnu ulogu nepolarnih komponenti u procesu koagulacije (Diaz et al., 1999). Takođe, Gebremichael i saradnici (2005) su u svojim ispitivanjima došli do zanimljivog zaključka da mali peptid (cekropin A, 4 kDa) ima sličnu koagulacionu aktivnost kao ekstrakt *M. oleifera*-e i aluminijum-sulfat, na osnovu čega se može očekivati da i brojni drugi mali peptidi prisutni u raznim biljkama mogu imati koagulacionu aktivnost.

Uopšteno, proces dobijanja prirodnih koagulanata iz biljnog materijala se može podeliti na tri glavne faze obrade: primarnu, sekundarnu i tercijarnu (Slika 7). Primarna obrada je veoma jednostavna, i većina istraživača koristi samo ovu fazu obrade kako bi simulirali tradicionalni način sušenja i mlevenja delova biljaka koji se generalno primenjuje u nekim lokalnim zajednicama u odsustvu sofisticirane procesne opreme. Ipak, ovakav način primene prirodnih koagulanata ima značajan nedostatak, s obzirom na to da dobijeni prah ne sadrži samo aktivne koagulantne materije, već i različita biljna tkiva koja su bogata organskim konstituentima i time povećavaju sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi. Ovaj problem se može prevazići daljom obradom dobijenog praha kroz sekundarnu (ekstrakcija aktivnih koagulacionih agenasa) i tercijarnu (prečišćavanje aktivnih koagulacionih agenasa) obradu. Ovi postupci svakako povećavaju troškove dobijanja prirodnih koagulanata.



Slika 7. Faze tokom procesa dobijanja prirodnih koagulanata iz biljaka (Yin, 2010)

### 2.3.1. Ekstrakcija prirodnih koagulanata

Ekstrakcija je tehnološka operacija kojom se iz sirovine biljnog i životinjskog porekla ekstrahuju, odnosno izdvajaju aktivne komponente pomoću određenog rastvarača – ekstragensa. Operacija ekstrakcije ima veliki značaj u savremenoj tehnologiji. Aktivne komponente se iz biljne sirovine ekstrahuju različitim metodama (maceracijom, perkolacijom i dr.) i pod različitim uslovima (usitnjenost sirovine, odnos sirovine i rastvarača, temperatura i pritisak ekstrakcije, vrsta ekstragensa i dr.), što zavisi od prirode biljnog materijala, stanja biljnog materijala i drugih faktora. Ekstrakcija uključuje nekoliko uzastopnih procesa:

- difuzija rastvarača u ćelije biljnog materijala,
- rastvaranje metabolita u rastvaraču,
- difuzija rastvarača s rastvorenim materijama izvan ćelija, i
- ispiranje.

Materijal koji se podvrgava ekstrakciji mora biti usitnjen do određenog stepena, jer od veličine čestica zavisi efikasnost i brzina ekstrakcije. Smanjenjem veličine čestica povećava se njihova specifična površina, odnosno međufazna površina čvrsto-tečno, i smanjuje se put koji prelazi rastvorak, što povećava brzinu ekstrakcije. S druge strane, ukoliko je materijal previše usitnjen, ometa se proticanje tečnosti, a razdvajanje tečnosti i čvrstih čestica postaje otežano.

Ekstrakti mogu biti tečni, praškasti, odnosno granulirani preparati. Danas se teži da svi ekstrakti budu standardizovanog i kontrolisanog kvaliteta. Uz ujednačen kvalitet sirovine, opremu i ustaljen način izvođenja procesa ekstrakcije, trebalo bi dobijati i ekstrakte standardnog kvaliteta. Zbog neujednačenog kvaliteta sirovine i rastvarača, kvalitet ekstrakata je promenljiv. Zato je sada uobičajeno da se standardizacija ekstrakata vrši na osnovu količine određenog sastojka sirovine, odnosno nekog “marker” jedinjenja koje je uvek prisutno u tkivu sirovine, i kasnije u dobijenom ekstraktu.

Prema literaturnim podacima (Pritchard et al., 2010b), uz manje razlike kod pojedinih autora, procedura dobijanja ekstrakata (prirodnih koagulanata) iz biljnog materijala je sledeća: određeni deo biljke se očisti od nepotrebnih delova, osuši i samelje; dobijeni prah se zatim proseje kroz sito određenog prečnika otvora i prosejana frakcija se dalje koristi za ekstrakciju;

odmeri se određena masa samlevenog i prosejanog biljnog materijala i delimično pokvasi ekstragensom tako da se obrazuje pasta, koja se dalje suspenduje u odgovarajućoj zapremini ekstragensa; tako dobijena suspenzija se meša tokom nekoliko minuta, a zatim filtrira, nakon čega se dobija ekstrakt, koji se uglavnom naziva „sirovi ekstrakt“.

Prirodni koagulanti se iz biljnog materijala mogu ekstrahovati različitim rastvaračima, kao što su organski rastvarači, voda ili rastvori soli, što na prvi pogled može biti zbunjujuće s obzirom na različite osobine ovih rastvarača i njihovu različitu hemijsku strukturu. U nekim slučajevima, u ovoj fazi se primenjuje više različitih rastvarača kojima se u odvojenim koracima ekstrahuju korisna i jestiva ulja (Ghebremichael et al., 2005) i aktivni koagulanti. Ekstrakcija vodom je svakako najprihvaćenija opcija zbog njenog obilja i cene, posebno u slučaju ekstrakcije iz *M. oleifera*-e, jer je njen aktivni koagulant protein rastvoran u vodi. Međutim, Okuda i saradnici (1999, 2001a, 2001b) su utvrdili da je ekstrakcija rastvorom NaCl efikasnija od ekstrakcije vodom. Naime, kroz svoje rezultate, oni su potvrdili da komponente ekstrahovane rastvorom NaCl (1 mol/l) imaju 7,4 puta bolju koagulacionu aktivnost prilikom uklanjanja mutnoće suspenzije kaolina pri duplo nižoj dozi od komponenata ekstrahovanih destilovanom vodom (Okuda et al., 1999). Takođe, ako se posmatra potrebna doza koagulanata za postizanje istog efekta bistrenja (11,8 NTU rezidualne mutnoće), potrebna je 32 puta manja doza ekstrakta dobijenog ekstrakcijom sa NaCl u poređenju sa ekstraktom dobijenim ekstrakcijom sa destilovanom vodom. U istom istraživanju, Okuda i saradnici su ispitali i koagulacionu aktivnost samog rastvora NaCl, kao i koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta *M. oleifera*-e kome je dodat 1 mol/l NaCl. Rezultati su pokazali da 1 mol/l NaCl nema koagulacionu aktivnost, dok je vodeni ekstrakt u koji je dodat NaCl imao znatno slabije performanse u poređenju sa ekstraktom dobijenim sa NaCl-om kao ekstragensom, na osnovu čega je izveden zaključak da NaCl ne poboljšava koagulaciju, već efikasnost ekstrakcije. Ovaj efekat poboljšanja je pripisan fenomenu usoljavanja proteina, kod koga prisustvo soli povećava disocijaciju protein-protein, pa rastvorljivost proteina raste sa porastom jonske jačine rastvora soli.

Kada su utvrdili da se rastvorom NaCl postiže bolja ekstrakcija u odnosu na vodu kao ekstragens, Okuda i saradnici su ispitali i uticaj jonske jačine rastvora NaCl na ekstrakciju, odnosno koagulacionu aktivnost dobijenog ekstrakta. Koagulaciona aktivnost se povećavala sa povećanjem koncentracije rastvora NaCl do 1 mol/l, a zatim je počela da se smanjuje. Ovo smanjenje koagulacione aktivnosti autori su objasnili fenomenom isoljavanja, kada rastvorljivost proteina opada sa porastom koncentracije soli pri velikim jonskim jačinama.

U istom radu (Okuda et al., 1999) autori su uporedili rastvore različitih soli kao ekstragense i utvrdili da nema značajnijih razlika u koagulacionoj aktivnosti ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa 1 mol/l rastvorima NaCl, KNO<sub>3</sub>, KCl i NaNO<sub>3</sub>. Takođe, oni su izneli pretpostavku da jonska jačina rastvora soli može biti glavni faktor za poboljšanje ekstrakcije aktivnih koagulacionih komponenata, pre nego vrsta soli. Uticaj jonske jačine na efikasnost koagulacije je dalje ispitivan primenom membrane za dijalizu. Uklanjanje jona NaCl-a dijalizom je rezultiralo obrazovanjem belog taloga u vrećici za dijalizu. Ova suspenzija u kojoj više nije bilo soli, nije posedovala koagulacionu aktivnost. Dodatkom 1 mol/l NaCl u ovu suspenziju, došlo je do rastvaranja taloga i ponovnog uspostavljanja koagulacione aktivnosti. Kako bi potvrdili da beli talog dobijen nakon dijalize sadrži komponente koje poseduju koagulacionu aktivnost, on je odvojen iz suspenzije centrifugiranjem, a zatim ponovo rastvoren u 1 mol/l NaCl. 1 mol/l NaCl je takođe dodat i u supernatant. Kao što je i očekivano, rastvor koji je sadržao rastvoreni beli talog je pokazao koagulacionu aktivnost, dok supernatant u koji je dodat NaCl nije imao nikakvu aktivnost.

Prasad (2009) je takođe ispitivao uticaj primene rastvora različitih soli za ekstrakciju aktivnih komponenti iz *M. oleifera*-e na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata. Za ekstrakciju su primenjeni 0,25 mol/l rastvori NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub> i KNO<sub>3</sub>. Koagulaciona aktivnost je ispitivana u melasnoj džibri (otpadna voda iz proizvodnje etanola na melasi) preko praćenja smanjenja boje u otpadnoj vodi. U ovom slučaju, rezultati su ukazali da postoji razlika u efikasnosti ekstrakata dobijenih ekstrakcijom rastvorima različitih soli. Najveću aktivnost su pokazali ekstrakti dobijeni sa NaCl-om i KCl-om kao ekstragensima (oko 77%), dok su ostali ekstrakti postigli efikasnost oko 55%. U istom radu, Prasad je ispitao i uticaj povećanja jonske jačine rastvora soli na efikasnost uklanjanja boje i utvrdio da sa povećanjem molariteta rastvora NaCl sa 0,25 mol/l na 1 mol/l, raste i koagulaciona aktivnost dobijenog ekstrakta, dok je u slučaju rastvora KCl trend obrnut – sa povećanjem jonske jačine rastvora KCl sa 0,25 mol/l na 1 mol/l opada koagulaciona aktivnost dobijenog ekstrakta. Ovakvu razliku u ponašanju ekstrakata autor objašnjava jakim efektom isoljavanja proteina koji se javlja u slučaju ispitivanih jonskih jačina rastvora KCl.

### 2.3.2. Uticaj prirodnih koagulanata na parametre vode koja se obrađuje

Ndabigengesere i Narasiah (1998a) su ispitivali uticaj vodenih ekstrakata *M. oleifera*-e na parametre vode (model voda dobijena suspendovanjem kaolina u česmenskoj vodi) koja je tretirana ovim koagulantima. Korišćeni su 5% ekstrakti dobijeni ekstrakcijom iz samlevenog oljuštenog i neoljuštenog semena, kao i 5% rastvor aluminijum-sulfata (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·18H<sub>2</sub>O).

Ekstrakti *M. oleifera*-e nisu uticali na pH vrednost model vode, dok je aluminijum-sulfat značajno snižavao pH, što kod praktične primene u slučaju aluminijum-sulfata implicira dodatnu potrošnju hemikalija kako bi se pH vrednost dovela u opseg propisan odgovarajućim standardima. Prasad (2009) je ispitivao uticaj ekstrakata *M. oleifera*-e, dobijenih ekstrakcijom sa rastvorima NaCl i KCl, na promenu pH vrednosti tretirane džibre. Ekstrakti nisu značajnije uticali na pH.

Ista situacija je bila u slučaju promene provodljivosti model vode nakon tretmana – ekstrakti *M. oleifera*-e nisu uticali na njenu provodljivost, dok je aluminijum-sulfat značajno povećavao. Povećanje provodljivosti nakon obrade vode aluminijum-sulfatom se pripisuje sulfatnim jonima koji zaostaju u obrađenoj vodi.

Alkalitet obrađene vode se nije menjao u slučaju primene ekstrakata *M. oleifera*-e, dok je u slučaju primene soli aluminijuma alkalitet sa 53 mg/l (izražen kao CaCO<sub>3</sub>) vrlo brzo pao na 0 mg/l. Smanjenje pH i alkaliteta, i povećanje jonske jačine tretirane vode su blisko povezani, i mogu dovesti do hemijskog disbalansa vode, što opet može dovesti do korozije u distributivnoj mreži. Uobičajena je praksa da se u vodu koja se tretira aluminijumom dodaju bikarbonati ili kreč kako bi se alkalitet održao na određenom nivou, što povećava zapreminu mulja, kao i ukupne troškove obrade vode.

Pri optimalnoj primenjenoj dozi, aluminijum-sulfat je proizvodio 4 – 5 puta više mulja u poređenju sa ekstraktima *M. oleifera*-e. Ovo se, u slučaju primene aluminijuma, objašnjava obrazovanjem aluminijum-hidroksida, koji je veoma voluminozan. U slučaju primene ekstrakata, samo se inicijalne suspendovane čestice ugrađuju u flokule i ne obrazuje se neki dodatni talog. Pored toga što su voluminozni, talozi aluminijuma su kiseli, želatinozni i teško se obezvodnjavaju. Troškovi obrade i odlaganja mulja su proporcionalni njegovoj količini, pa je to još jedan argument na stranu primene prirodnih koagulanata.

Što se tiče sadržaja ortofosfata u obrađenoj vodi, aluminijum-sulfat blago snižava njihovu koncentraciju, dok je ekstrakti *M. oleifera*-e značajno povećavaju. Ortofosfati zbog

njihove dobre rastvorljivosti nisu direktno uključeni u reakcije koje se dešavaju tokom koagulacije, pa stoga značajna količina preostaje u obrađenoj vodi.

Koncentracija  $\text{SO}_4^{2-}$  jona u obrađenoj vodi se ne menja kada se za njenu obradu koriste ekstrakti *M. oleifera*-e. U slučaju primene aluminijum-sulfata, sadržaj sulfatnih anjona u vodi se značajno povećava nakon njene obrade. Sadržaj ovih jona u vodi za piće se ograničava usled njihovog laksativnog dejstva pri većim koncentracijama.

Sadržaj hlorida se ne menja značajnije sa povećanjem doze bilo kog od tri ispitivana koagulaciona sredstva.

Aluminijum-sulfat ne utiče značajnije na sadržaj nitrata u obrađenoj vodi, a ekstrakti *M. oleifera*-e povećavaju blago njihov sadržaj. Razlog zbog koga nitrati preostaju u obrađenoj vodi u slučaju primene ekstrakata je isti kao i u slučaju ortofosfata.

Nijedan od tri primenjena koagulantna nije značajnije uticao na sadržaj jona kalcijuma i magnezijuma u obrađenoj vodi. Što se tiče ekstrakata *M. oleifera*-e, ovakvi rezultati su u suprotnosti sa zaključkom do koga su došli Muyibi i Evison (1995a) da se ekstrakt ove biljke može koristiti za omekšavanje vode.

Što se tiče sadržaja organskih materija u obrađenoj vodi, Ndabigengesere i Narasiah (1998a) su utvrdili da aluminijum-sulfat ne utiče na ovaj parametar. Ekstrakti *M. oleifera*-e, pak, značajno povećavaju sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi, jer neke od organskih materija koje su prisutne u sirovim ekstraktima preostaju u njoj. Prirodni koagulantni su organska jedinjenja, pa njihovim dodavanjem u vodu koja se obrađuje koagulacijom, može doći do povećanja sadržaja organskih materija. Organske materije mogu dovesti do pojave boje, ukusa i mirisa vode, do rasta mikroorganizama, do smanjenja baktericidnog dejstva sredstava za dezinfekciju vode (jer reaguju sa njima), i što je najvažnije do obrazovanja veoma štetnih nus-proizvoda dezinfekcije ukoliko se ona izvodi hlorom. Paleta jedinjenja koja nastaju je toliko velika, da se još uvek ne znaju strukture svih koja mogu nastati, kao ni eventualni negativni uticaji na zdravlje, naročito pri hroničnom unosu malih količina. Zbog svega toga je potrebno posebno ispitati doprinos prirodnih koagulanata povećanju sadržaja organskih materija u obrađivanoj vodi.

U eksperimentima koagulacije koje su izveli Šćiban i saradnici (2009) sa ekstraktima kestena i žira u model vodi sa kaolinom, u svim slučajevima je došlo do povećanja sadržaja organskih materija izraženog preko permanganatnog broja. Ovo povećanje zavisi od sadržaja rastvorenih organskih materija koje se nisu istaložile sa flokulama tokom procesa koagulacije. Sadržaj zaostalih organskih materija u obrađenoj vodi nije bio proporcionalan ni sadržaju suve materije, niti sadržaju proteina u primenjenim ekstraktima.

Ovaj fenomen je primećen i prilikom primene drugih prirodnih koagulanata. Ghebremichael i saradnici (2005) navode da je glavni nedostatak primene ekstrakta *M. oleifera*-e za obradu vode značajno povećanje sadržaja organskih materija. Jahn (1988) je utvrdio da se voda tretirana sirovim ekstraktom *M. oleifera*-e ne bi trebala čuvati duže od 24 časa. Sirovi ekstrakt stoga nije generalno pogodan za primenu u velikim sistemima za pripremu i distribuciju vode, u kojima je hidrauličko vreme zadržavanja vode dugo. Ghebremichael i saradnici (2005) za rešavanje tog problema predlažu da se sirovi ekstrakt prečisti tako da se iz njega uklone materije koje nemaju koagulacionu aktivnost.

### 2.3.3. Prečišćavanje prirodnih koagulanata

Tercijarna obrada (prečišćavanje) prirodnih koagulanata se retko izvodi u slučaju koagulanata koji se dobijaju iz biljaka jer značajno povećava ukupne troškove dobijanja

koagulanta, i trenutno je ograničena na naučna ispitivanja prečišćavanja ekstrakta *M. oleifera*-e (Ghebremichael et al., 2005; Okuda et al., 2001b). Preliminarna ispitivanja sugerišu da su izmena jona (Ghebremichael et al., 2005) i dijaliza (Okuda et al., 2001b) izvodljiva rešenja za prečišćavanje ekstrakta *M. oleifera*-e, koja mogu biti inkorporirana kroz *scale-up* u tretman većih količina mutne vode.

### **2.3.3.1. Prečišćavanje prirodnih koagulanata primenom hromatografije sa izmenom jona**

Biomolekuli se mogu prečistiti hromatografskim tehnikama, u kojima se oni razdvajaju na osnovu razlika u njihovim specifičnim osobinama. Jonoizmenjivačka hromatografija razdvaja biomolekule na osnovu razlika u njihovom neto površinskom naelektrisanju. Jonoizmenjivačka hromatografija kao metoda za razdvajanje biomolekula je ušla u primenu još 60-ih godina prošlog veka, ali i danas ima glavnu ulogu u njihovom razdvajanju i prečišćavanju. Danas je jonoizmenjivačka hromatografija jedna od najčešće korišćenih tehnika za prečišćavanje proteina, peptida, nukleinskih kiselina i drugih naelektrisanih biomolekula, koja pruža mogućnost postizanja visoke rezolucije i razdvajanja po grupama, uz veliki kapacitet. Jonoizmenjivačkom hromatografijom je moguće razdvojiti molekulske vrste koje se minimalno razlikuju po naelektrisanju – na primer, moguće je razdvojiti dva proteina koji se razlikuju samo u jednoj naelektrisanj aminokiselini. Ovakve karakteristike čine jonoizmenjivačku hromatografiju pogodnom za vezivanje, intermedijarno prečišćavanje ili polirajući stepen tokom postupka prečišćavanja, kao i za primenu za laboratorijsko prečišćavanje i analizu, ali i za prečišćavanje velikih količina proizvoda.

Kao što je već rečeno, jonoizmenjivačkom hromatografijom se molekuli razdvajaju na osnovu razlika u njihovom neto površinskom naelektrisanju. Električne osobine molekula veoma variraju, pa će oni u različitom stepenu pokazati interakciju sa naelektrisanim medijumom za hromatografiju u zavisnosti od razlika u njihovom ukupnom naelektrisanju, gustini naelektrisanja i distribuciji naelektrisanja na površini. Naelektrisane grupe u molekulima koje doprinose njegovom površinskom naelektrisanju imaju različite pKa vrednosti u zavisnosti od njihove strukture i hemijskog mikrokruženja.

Neto površinsko naelektrisanje svih molekula koji sadrže jonizujuće grupe veoma zavisi od pH vrednosti. U slučaju proteina, koji su izgrađeni od mnogo različitih aminokiselina koje sadrže slabo kisele i bazne grupe, njihovo neto površinsko naelektrisanje će se menjati postepeno sa promenom pH vrednosti sredine, tj. proteini spadaju u amfoterna jedinjenja. Svaki protein ima svoju jedinstvenu krivu zavisnosti neto površinskog naelektrisanja od pH, tj. titracionu krivu. Ova kriva opisuje kako se ukupno neto naelektrisanje proteina menja sa promenom pH sredine. Jonoizmenjivačka hromatografija se bazira upravo na činjenici da je odnos između neto površinskog naelektrisanja i pH vrednosti jedinstven za svaki protein. Protein koji nema naelektrisanja na pH vrednosti ekvivalentnoj njegovoj izoelektričnoj tački (IET) neće ostvariti interakciju sa naelektrisanim medijumom. Na pH vrednostima iznad njegove izoelektrične tačke, protein će se vezivati za pozitivno naelektrisani medijum, odnosno anjonit, a na pH vrednostima ispod njegove izoelektrične tačke za negativno naelektrisani medijum, odnosno katjonit. Pored jonskih, mogu se odvijati i drugi tipovi interakcija, i to uglavnom Van der Valsove i hidrofobne interakcije, ali su njihovi efekti veoma mali.

Jonoizmenjivački medijum predstavlja matriks sastavljen od sfernih čestica, koje sadrže jonske grupe negativno (katjonit) ili pozitivno (anjonit) naelektrisane. Matriks (jonoizmenjivačka smola) je najčešće porozan i ima veliku površinu pora (veliku specifičnu površinu). On se pakuje u kolonu, a zatim uravnotežava puferom koji ispunjava pore, kao i

prostor između čestica. pH vrednost i jonska jačina pufera se biraju tako da obezbede da se, kada se nanese uzorak, proteini koji se iz njega žele izdvojiti vežu za matriks, a što je moguće više nečistoća da ostane nevezano. Proteini koji se vežu se na taj način koncentrišu na matriksu, dok proteini koji nemaju odgovarajuće naelektrisanje prolaze kroz kolonu nošeni puferom kojim se kolona ispira nakon nanošenja uzorka, i bivaju eluirani. Kada se nanese sav uzorak i kolona ispere tako da iz nje izađu svi proteini koji se nisu vezali, uslovi se menjaju kako bi se eluirali vezani proteini. Ovo se najčešće izvodi povećanjem jonske jačine (koncentracije soli) pufera, ili ređe promenom pH vrednosti. Kako se povećava jonska jačina, joni soli (najčešće  $\text{Na}^+$  ili  $\text{Cl}^-$ ) se takmiče sa vezanim komponentama za naelektrisana mesta na površini medijuma, pa jedna ili više vezanih vrsta počinju da bivaju eluirane, i da se kreću ka izlazu iz kolone. Proteini sa najmanjim neto naelektrisanjem na datoj pH vrednosti će biti eluirani prvi sa povećanjem jonske jačine, dok će proteini sa najvećim naelektrisanjem najduže ostati vezani, i eluirati se poslednji. Što je veće neto naelektrisanje proteina, potrebna je veća jonska jačina za njegovo eluiranje. Kontrolisanom promenom jonske jačine, primenom različitih formi gradijenta koncentracije, proteini se eluiraju postepeno u prečišćenju i koncentrisanoj formi.

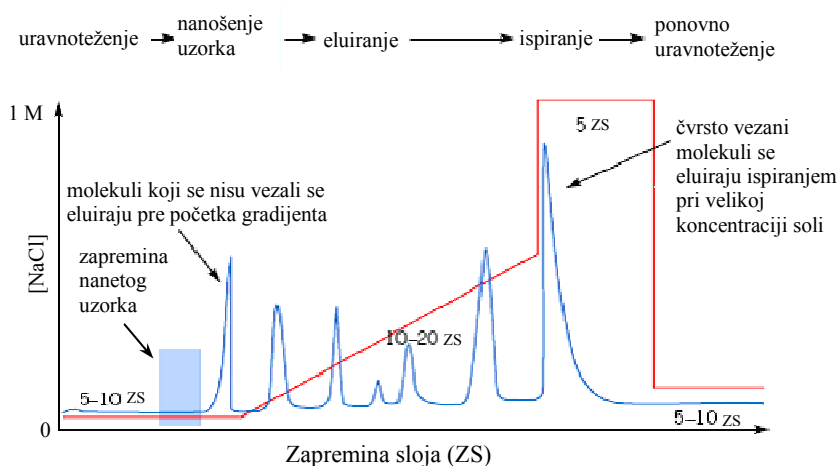
Rezolucija razdvajanja u jonoizmenjivačkoj hromatografiji zavisi od stepena razdvajanja pikova (selektivnost jonoizmenjivačkog medijuma), sposobnosti jonoizmenjivačke kolone da uske i simetrične pikove (efikasnost) i naravno količine (mase) nanesenog uzorka. Na ove činioce utiču praktični aspekti, kao što su osobine matriksa, uslovi vezivanja i eluiranja, pakovanje kolone i protok. Efikasnost kolone (sposobnost da uske, simetrične pikove) se najčešće izražava preko broja teorijskih podova. U kolonama koje su pakovane neravnomerno, previše čvrsto, previše rastresito, ili u kojima ima mehurića vazduha, će se pojaviti kanali, odnosno neravnomerno proticanje pufera kroz sloj jonoizmenjivača, što će dovesti do smanjenja njene efikasnosti, i gubitka rezolucije. Svakako, veličina zrnca jonoizmenjivača je značajan faktor za rezoluciju, i generalno, najmanja zrnca će dati najuže pikove pod optimalnim uslovima eluiranja i u dobro pakovanoj koloni. Dobra selektivnost (stepen razdvajanja pikova) je značajniji faktor za postizanje dobre rezolucije nego visoka efikasnost, i ne zavisi samo od prirode i broja funkcionalnih grupa na jonoizmenjivačkom matriksu, već i od eksperimentalnih uslova, kao što su pH, jonska jačina i uslovi eluiranja.

Kapacitet jonoizmenjivačkog medijuma je kvantitativna mera njegove sposobnosti da veže suprotno naelektrisane jone (proteine ili druge naelektrisane molekule). Ukupni kapacitet predstavlja broj naelektrisanih funkcionalnih grupa po ml medijuma, i to je fiksni parametar svakog medijuma. Od većeg praktičnog značaja je stvarna količina proteina koja može biti vezana na jonoizmenjivački medijum pod definisanim eksperimentalnim uslovima. Ovaj parametar predstavlja dostupni kapacitet jonoizmenjivačkog medijuma. Ukoliko definisani eksperimentalni uslovi obuhvataju i protok pri kome se radi, vezana količina proteina predstavlja dinamički kapacitet medijuma. Dostupni i dinamički kapacitet zavise od osobina proteina, jonoizmenjivačkog medijuma i eksperimentalnih uslova. Kapacitet jonoizmenjivačkog medijuma će varirati u zavisnosti od veličine molekula datih proteina (jer ona utiče na njihovu sposobnost ulaska u pore matriksa) i njihove zavisnosti naelektrisanje/pH (protein mora nositi odgovarajuće neto naelektrisanje u odgovarajućoj gustini na svojoj površini, na izabranom pH).

Količina uzorka koja se može naneti na kolonu zavisi od dinamičkog kapaciteta jonoizmenjivača i rezolucije koju je potrebno postići. Količina uzorka ima glavni uticaj na rezoluciju jer je širina pikova direktno povezana sa količinom prisutnih materija koje se vezuju u koloni. Stoga, kako bi se postigla zadovoljavajuća rezolucija, ukupna naneta količina proteina ne treba da prelazi ukupni kapacitet kolone.

Stvarni (dinamički) kapacitet takođe zavisi od faktora kao što su veličina i oblik molekula, veličina pora matriksa, protok, koncentracija uzorka, pH/naelektrisanje proteina i jonska jačina. Kapacitet će se smanjivati za molekule velikog prečnika ili dužine, jer takvi molekuli neće moći da uđu u pore matriksa, pa je njihovo vezivanje ograničeno primarno na naelektrisane grupe na površini matriksa.

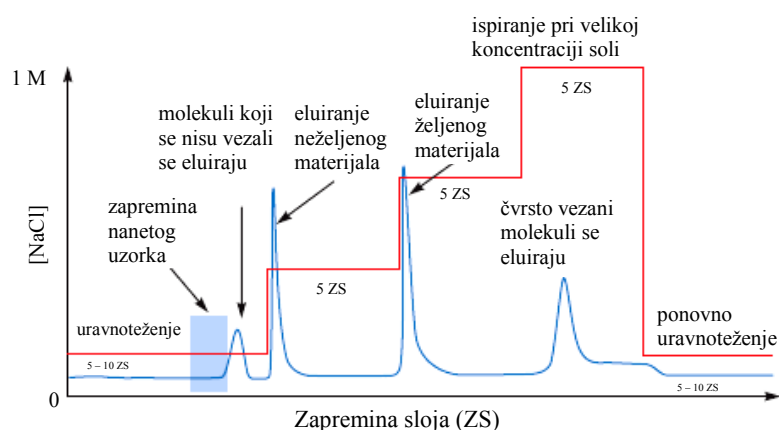
Vezani proteini se eluiraju kontrolisanom promenom jonske jačine ili pH. Eluiranje promenom jonske jačine se češće primenjuje, a može se izvoditi u linearnom i eksponencijalnom gradijentu koncentracije, ili tzv. stepenastim eluiranjem. Jonoizmenjivačka hromatografija uz eluiranje u linearnom gradijentu i eluiranje primenom stepenastog gradijenta je prikazana na Slikama 8 i 9, respektivno. Zapremine pufera koje se primenjuju tokom nanošenja uzorka, eluiranja, ispiranja i ponovnog uravnoteženja kolone su izražene u zapreminama sloja, tako da je npr. 5 ZS = 5 ml za kolonu napunjenu sa 1 ml jonoizmenjivačke smole. Broj zapremina sloja koji se primenjuje tokom svakog stupnja razdvajanja se često može redukovati optimizacijom.



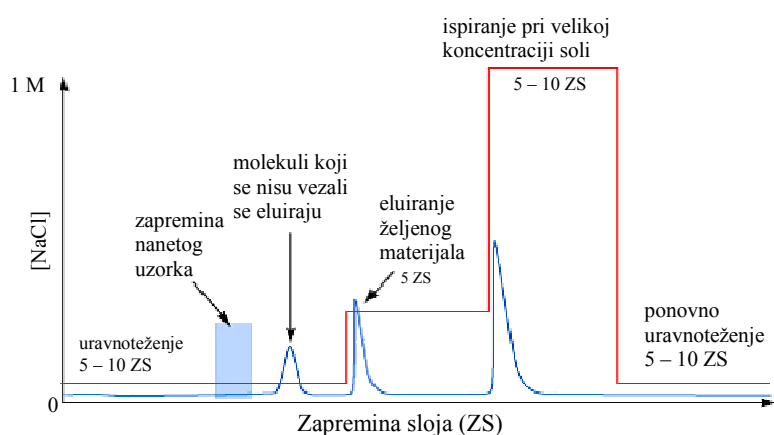
**Slika 8.** Jonoizmenjivačko razdvajanje uz eluiranje u linearnom gradijentu jonske jačine eluenta (Amersham Biosciences, 2014)

Linearni gradijent (Slika 8) jonske jačine eluenta je najčešće primenjivan tip eluiranja, i treba ga uvek koristiti kada se započinje ispitivanje nepoznatog uzorka (kada je poenta da se u koloni veže što je više materija moguće, koje se zatim eluiraju diferencijalno kako bi se stekao uvid u ukupni proteinski profil). Takođe se primenjuje kada se želi postići visoka rezolucija razdvajanja. Pri malim jonskim jačinama eluenta, kompeticija za naelektrisane grupe na jonoizmenjivačkom medijumu je mala. Povećanjem njegove jonske jačine, povećava se i ova kompeticija, i smanjuje interakcija između medijuma i vezanih materija, koje onda počinju da se eluiraju. Puffer za eluiranje je najčešće isti puffer koji je korišćen za uravnotežavanje kolone, a koji sada dodatno sadrži so, najčešće natrijum-hlorid. Rezultati dobijeni eluiranjem u linearnom gradijentu jonske jačine eluenta mogu onda da posluže kao baza za optimizaciju razdvajanja. Zadržavanje naelektrisanih proteina na jonoizmenjivačkom medijumu zavisi od zapremine kolone i promene koncentracije duž nje. Dugački, blagi gradijenti daju maksimalno razdvajanje između pikova, ali je vreme razdvajanja duže, a osnova pikova šira. Kratki, strmi gradijenti daju brže razdvajanje i oštrije pikove, ali se pikovi eluiraju blizu jedan drugog. Pikovi koji se eluiraju kasnije u gradijentu, imaju tendenciju da budu nešto širi od onih koji se eluiraju ranije.

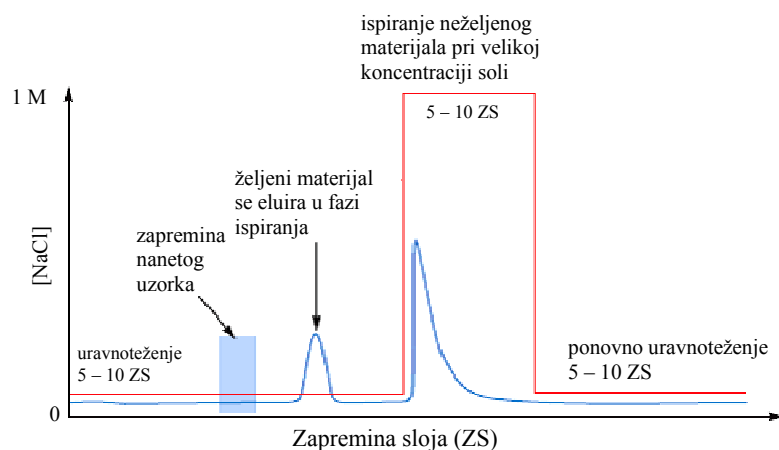




a)



b)



c)

**Slika 9.** Jonoizmenjivačko razdvajanje uz eluiranje primenom stepenastog gradijenta jonske jačine eluenta (Amersham Biosciences, 2014)

Stepenasto eluiranje se postiže sekvencijalnim dodavanjem rastvora soli u puferu uz povećanje jonske jačine (kao što je prikazano na Slici 9a). Stepenasto eluiranje je tehnički jednostavno, ali se mora obratiti posebna pažnja kod dizajniranja stepenika (kod izbora jonskih jačina rastvora kojima će biti izvedeno eluiranje) i tumačenja rezultata, jer se materije koje se eluiraju naglom promenom jonske jačine eluiraju blizu jedna drugoj, dajući lažni pik

koji može sadržati više različitih komponenti. Stepenasto eluiranje se može izvoditi sa tri cilja: postizanje bržeg razdvajanja i smanjenje potrošnje pufera (Slika 9a), grupno razdvajanje (Slika 9b) i uklanjanje kontaminanata (Slika 9c). Kada je jonoizmenjivačko razdvajanje prethodno optimizovano primenom eluiranja u gradijentu koncentracije eluenta, prelaskom na stepenasto eluiranje smanjuje se ukupan broj zapremina sloja potreban za razdvajanje, što ubrzava vreme razdvajanja i smanjuje potrošnju pufera, zadržavajući pri tome potreban stepen prečišćenosti. Kod grupnog razdvajanja molekuli od interesa se koncentrišu i brzo odvajaju od neželjenih materija. Kada se odrede uslovi vezivanja i eluiranja ciljnih proteina i kontaminanata (najčešće tokom prethodnog razdvajanja uz eluiranje u gradijentu koncentracije eluenta), radni uslovi se biraju tako da se favorizuje vezivanje ciljnih proteina i minimizira vezivanje kontaminanata. Ciljni proteini se zatim eluiraju jednom promenom pufera, u koncentrovanom obliku. Ukoliko se uslovi izaberu tako da se favorizuje vezivanje kontaminanata, nije potrebno izvoditi eluiranje (ukoliko će se jonoizmenjivačka smola nakon postupka odbaciti), jer će ciljni proteini u tom slučaju proći kroz kolonu.

S obzirom na to da je neto naelektrisanje proteina zavisno od pH, eluiranje sa jonoizmenjivačke smole može biti izvedeno i promenom pH vrednosti pufera za eluiranje. Pošto u tom slučaju nema promene koncentracije soli, uzorci se jednostavno zadržavaju u koloni na jednoj pH vrednosti, a eluiraju povećanjem ili smanjenjem pH. Različite naelektrisane grupe u uzorku i na jonoizmenjivačkom matriksu se titrišu dok ne postanu neutralne ili suprotno naelektrisane od jonoizmenjivačkog medijuma, kada se uzorak eluira. S obzirom da eluiranje promenom pH podrazumeva rad na pH vrednostima bliskim izoelektričnoj tački proteina, gde mnogi proteini pokazuju minimum rastvorljivosti, moraju se preduzeti mere kako bi se izbegla precipitacija u koloni. Kod bilo kog tipa eluiranja promenom pH vrednosti, posebna pažnja se mora posvetiti izboru i mešanju puferskih sistema kako bi se postigla reproduktivnost. Stupnjevito pH eluiranje je jednostavnije izvesti, a takođe je i reproduktivnije od linearnog pH gradijenta.

Protok koji se može primeniti tokom hromatografskog razdvajanja može varirati u zavisnosti od faze razdvajanja. Na primer, tokom nanošenja uzorka i eluiranja, niži protok obezbeđuje dovoljno vremena komponentama prisutnim u uzorku da difunduju u/iz pora, u zavisnosti od toga da li se vezuju ili disosuju sa funkcionalnih grupa matriksa. Veći protok se može primeniti tokom uravnotežavanja, ispiranja i ponovnog uravnotežavanja kolone, a on je primarno uslovljen mehaničkom otpornošću medijuma i specifikacijom opreme vezano za pritisak.

Analiza rezultata prvog hromatografskog razdvajanja će ukazati na to da li se uslovi mogu promeniti kako bi se povećao prinos, postigla veća čistoća, ubrzalo razdvajanje ili povećala količina uzorka koja se može obraditi u jednom razdvajanju.

### ***2.3.3.2. Prečišćavanje prirodnih koagulanata izdvajanjem nepolarnih materija ekstrakcijom fluidima u superkritičnom stanju i Soxhlet ekstrakcijom***

Izdvajanjem nepolarnih materija iz biljnog materijala, a zatim ekstrakcijom nekim klasičnim tečnim rastvaračem se može dobiti ekstrakt promenjenog sastava u odnosu na ekstrakt koji se dobija bez prethodnog izdvajanja nepolarnih materija, i u tom smislu bi on bio prečišćen. Fluidi u superkritičnom stanju (na pritisku i temperaturi iznad kritičnih) imaju znatno veću rastvorljivost i stepen selektivnosti od klasičnih tečnih rastvarača koji se koriste u ekstrakciji. Njihov dinamički viskozitet i gustina su niski, dok je koeficijent difuzije čak oko 100 puta veći od onih kod standardnih ekstragenasa. Pošto se ekstrakcija gasovima u superkritičnom stanju zasniva na prelasku isparljivih komponenata iz polaznog materijala u

superkritični fluid, izdvajanje željenih komponenata iz superkritičnog fluida postiže se snižavanjem pritiska i/ili temperature radnog fluida. Prednosti superkritične ekstrakcije u odnosu na klasičnu ekstrakciju su:

- kontrola moći rastvaranja superkritičnog fluida promenom pritiska i temperature,
- lako uklanjanje superkritičnog fluida iz ekstrakta, snižavanjem pritiska,
- ekstrahovanje komponenata visokih temperatura ključanja na relativno niskim temperaturama,
- znatno bolje rastvaranje faza, koje nije moguće postići klasičnom ekstrakcijom, i
- ekstrahovanje termolabilnih komponenti sa minimalnim deformacijama, zbog rada na niskim temperaturama.

Nedostaci superkritične ekstrakcije su:

- rad na visokim pritiscima,
- složena regeneracija korišćenih rastvarača, odnosno znatni energetske troškovi, i
- veliki investicioni troškovi za procesnu opremu.

Ugljen-dioksid ima izrazitu prednost kao rastvarač za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz sirovina biljnog porekla. Ugljen-dioksid se nalazi u tečnom stanju na pritiscima u intervalu od 5 do 74 bar i temperaturama od -55 do 31°C. Tečni ugljen-dioksid ohlađen ispod kritične temperature (31,3°C) poseduje visoku moć rastvaranja, koja u maloj meri zavisi od pritiska. Na temperaturi većoj od 31,3°C i pritisku iznad 72 bar (ugljen-dioksid u superkritičnom stanju), sa promenom pritiska i temperature sposobnost rastvaranja ugljen-dioksida varira u širokim granicama. Na taj način se može, pogodnim izborom ovih parametara, ostvariti selektivna ekstrakcija prirodnih aktivnih supstanci.

Ugljen-dioksid u superkritičnom stanju ima osobine nepolarnog rastvarača, pa se njegovom primenom iz ispitivanog materijala mogu ekstrahovati nepolarne komponente: etarska ulja, masne kiseline, jedinjenja sterolne strukture, određeni vitamini, voskovi, itd. Da bi se ekstrahovale umereno polarne komponente, dodaju se modifikatori, kao što su metanol, etanol, aceton, ugljen-disulfid, sumpor-dioksid, heksan, toluen, hloroform i dr. Prednosti ugljen-dioksida u odnosu na ostale gasove su sledeće:

- netoksičan je za ljudski organizam,
- nezapaljiv,
- jeftin je i lako dostupan,
- bez mirisa i ukusa, što omogućava njegovu upotrebu u prehrambenoj industriji,
- omogućava frakcionisanje i selektivnu ekstrakciju,
- ima relativno niske vrednosti kritičnih parametara u odnosu na ostale gasove koji se primenjuju u ovoj tehnologiji, i
- lako se odvaja od ekstrakata.

Ekstrakcija se izvodi ugljen-dioksidom u ekstraktoru na određenoj temperaturi i pritisku (koji se nalaze u superkritičnoj oblasti) i pri određenom protoku ekstragensa, a dobijeni ekstrakt se od ugljen-dioksida odvaja u separatoru pri uslovima sniženog pritiska i temperature, odnosno pri uslovima pod kojima ugljen-dioksid prelazi u gasovito stanje.

Lipidi su rastvorljivi u organskim rastvaračima i umereno rastvorljivi ili nerastvorljivi u vodi. Rastvorljivost lipida je važan kriterijum za njihovo dobijanje iz izvornog materijala, i u velikoj meri zavisi od udela polarnih (uglavnom trigliceroli) i nepolarnih lipida (uglavnom

fosfolipidi i glikolipidi) u uzorku. Jedan od načina izolovanja lipida je i Soxhlet ekstrakcija upotrebom odabranog rastvarača. Da bi se lipidi izdvojili iz izvornog materijala, u određenim slučajevima je neophodno da se izvrši sušenje uzorka pre ekstrakcije kako bi ona bila efikasna i potpuna. Ekstrakcija lipidnih komponenata je otežana ukoliko sadržaj vlage u uzorku prelazi 10% (Wrolstad, 2001). Faktori koji utiču na proces ekstrakcije su:

- stepen usitnjenosti materijala,
- dužina trajanja procesa ekstrakcije,
- viskozitet,
- temperatura, i
- vrsta rastvarača (petrol-etar, n-heksan, metilen-hlorid i dr.).

Soxhlet ekstrakcija je polukontinualan proces u kome se rastvarač s ekstrahovanim materijama isprazni u posudu, svež rastvarač se kondenzuje i ekstrahuje biljni materijal, što čini ovaj proces kraćim uz upotrebu manje zapremine rastvarača. Mana ovog postupka je u tome što se ekstrakt kontinualno zagreva na temperaturu ključanja rastvarača, što može dovesti do nastanka različitih jedinjenja. Vreme ekstrakcije je dugo i uglavnom su potrebne velike količine rastvarača i uzorka.

Ekstrakcija po Soxhletu je proces koji se izvodi tako što se pogodan rastvarač zagreva pomoću grejnog tela. Pri tome, pare rastvarača koje se oslobađaju pri ključanju dolaze do povratnog hladnjaka u kome se kondenzuju i kao tečnost vraćaju u ekstrakcioni deo. U ekstrakcionom delu rastvarač dolazi u kontakt sa usitnjenim i homogenizovanim uzorkom koji se nalazi u poroznoj čauri, pri čemu se ekstrahuju lipidne komponente iz uzorka. Nivo rastvora u ekstrakcionom delu stalno raste zbog priliva rastvarača iz hladnjaka i u momentu kada nivo rastvora bude iznad gornje sifonske cevi, ceo rastvor će se prelitati (sifonirati) u balon. Na ovaj način se ekstrakcija nastavlja do iscrpljenja uzorka.

Koncentrisanje dobijenog ekstrakta podrazumeva delimično ili potpuno uklanjanje rastvarača. U tečnoj sredini dolazi do degradacije aktivnih komponenata, pa samim tim i do kvalitativnih i kvantitativnih promena sastava ekstrakta. Uklanjanjem rastvarača postiže se veća hemijska stabilnost i ekonomičnost, pošto se isti rastvarač može ponovo koristiti. Rastvarač mora da ispuni zahtev da ne ostavlja nikakav ostatak pri uparavanju. Kao rastvarači, najčešće se koriste bezvodni petrol-etar, n-heksan ili benzen. Preostale lipidne materije nakon otparavanja rastvarača se suše 1 čas na temperaturi od 103°C do 105°C i posle sušenja važu. Iz razlike mase punog i praznog balona određuje se sadržaj lipida u uzorku.

Ukoliko se lipidne materije teško ekstrahuju iz uzorka, nakon prve, izvode se naknadne ekstrakcije, pre kojih se materijal sa delimično ekstrahovanim lipidnim komponentama dobro usitni i homogenizuje pomoću kvarcnog peska. Naknadne ekstrakcije traju obično kraće od prve, ali je postupak potpuno isti.

### ***2.3.3.3. Prečišćavanje prirodnih koagulanata frakcionisanjem ultrafiltracijom***

Ultrafiltracija predstavlja membranski proces, pri kome se molekuli prisutni u rastvoru razdvajaju na osnovu njihovih veličina. Pogonska sila za transport rastvarača kroz membranu kod ultrafiltracije je razlika pritisaka. Membrana predstavlja barijeru sa izuzetno složenom strukturom šupljina, koja razdvaja dve faze, i pri tome ograničava transport nekih hemijskih vrsta. Rastvor koji prođe kroz membranu se naziva permeat, a deo rastvora koji zaostane na membrani predstavlja retentat. Ultrafiltracijom se iz rastvora mogu izdvajati molekuli sa

molekulskim masama od 500 do 1000000 Da, pa i više, kao što su na primer: proteini, polimeri, skrob, glina, čestice lateksa i različiti mikroorganizmi.

Veličina molekula koji će proći kroz membranu zavisi od prečnika pora. U tom smislu najvažnija karakteristika membrane je MWCO (*molecular weight cut off*). MWCO predstavlja najnižu vrednost molekulske mase (izražene u Da) onih molekula koje membrana zadržava sa efikasnošću 90%. Jednostavnije rečeno MWCO bi predstavljao granicu između onih molekula koji prolaze kroz membranu i onih koji na njoj bivaju zadržani.

Na permeabilnost ultrafiltracionih membrana, pored molekulskih masa molekula, utiče i oblik molekula, pa tako globularni molekuli neke molekulske mase bivaju zadržani na membrani, što nije slučaj sa linearnim molekulima istih molekulskih masa. Linearni molekuli u nekim slučajevima mogu biti propušteni kroz membranu, naročito ako se radi o membrani sa uniformnim porama. Takođe je od važnosti i naelektrisanje molekula, sastav membrane i njeno naelektrisanje, ukoliko ga ima, koncentracija rastvora i njegov sastav.

#### **2.3.3.4. Istraživanja vezana za prečišćavanje prirodnih koagulanata**

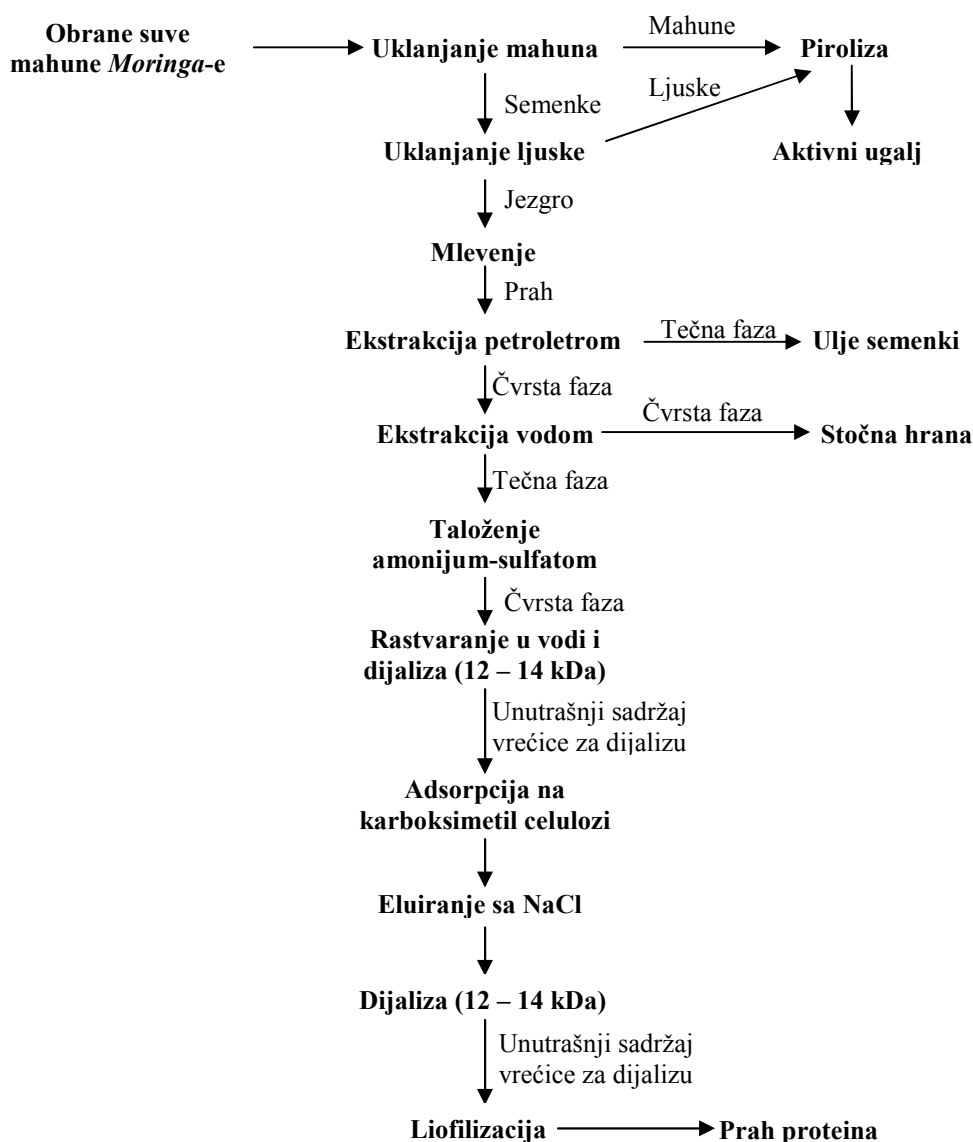
Okuda i saradnici (1999) su izveli prečišćavanje (izolovanje) aktivnih komponenti iz ekstrakta dobijenog ekstrakcijom semena *M. oleifera*-e sa 1 mol/l NaCl metodom po Sevag-u, a zatim dijalizom. Inicijalno, prečišćavanje metodom po Sevag-u (uobičajena procedura prečišćavanja proteina) je primenjeno kako bi se uklonili neaktivni proteini, polisaharidi i lipidi iz ekstrakta, i ovako prečišćen ekstrakt nije izgubio na svojoj koagulacionoj aktivnosti. Nakon toga, izvedena je dijaliza kako bi se uklonile komponente manje od 12 – 14 kDa. Talog koji nastaje tokom dijalize je odvojen od suspenzije centrifugiranjem, a zatim rastvoren u 1 mol/l NaCl. Dobijeni rastvor je pokazao istu koagulacionu aktivnost kao polazni ekstrakt, na osnovu čega su autori rada izveli zaključak da aktivne komponente u *M. oleifera* verovatno imaju molekulske mase veće od 12 kDa, što je bilo slično rezultatima koje su ranije dobili Ndabigengesere i saradnici (1995) ispitujući vodeni ekstrakt ove biljke.

Ghebremichael i saradnici (2005) su predložili prečišćavanje vodenog i NaCl ekstrakta *M. oleifera*-e na katjonskoj jonoizmenjivačkoj smoli. Elucioni dijagrami i jednog i drugog ekstrakta su ukazali na prisustvo 3 proteinska pika, od kojih su po dva za svaki ekstrakt pokazala dobru koagulacionu aktivnost. Prisustvo po dva aktivna pika je objašnjeno heterogenošću aktivnih proteina prisutnih u ekstraktima. Ove dve frakcije su imale slične molekulske mase određene SDS-PAGE elektroforezom, ali različite izoelektrične tačke, što je bilo i očekivano s obzirom na njihovo različito eluiranje sa katjonskog menjača jona. Na osnovu ovakvih rezultata jasno je da se svaka proteinska frakcija dobijena nakon katjonske jonoizmenjivačke hromatografije ne sastoji od jednog, homogenog proteina, već predstavlja smešu proteina sličnih fizičkih karakteristika. Ovi rezultati su pokazali da je ovakvo jednostepeno fracionisanje dovoljno za uklanjanje većine neaktivnih proteina iz sirovog ekstrakta *M. oleifera*-e kako bi se dobio uzorak obogaćen proteinima koji poseduju koagulacionu aktivnost.

U drugom radu, Ghebremichael i saradnici (2006) su ispitivali prečišćavanje sirovog ekstrakta *M. oleifera*-e na katjonskoj jonoizmenjivačkoj smoli CM Sepharose Fast Flow u šaržnom postupku. Autori su utvrdili da se na ovaj način postiže dobro odvajanje organskih i drugih materija koje nemaju koagulacionu aktivnost od onih koje je imaju u sirovom ekstraktu. Dobijene prečišćene frakcije imaju znatno niži sadržaj nutrijenata (fosfata i nitrata) u poređenju sa sirovim ekstraktom. Takođe, ovako prečišćene frakcije ne povećavaju sadržaj organskih materija (izražen preko HPK) u tretiranoj vodi čak ni pri visokim primenjenim dozama, koje su veće od optimalne doze za postizanje maksimuma smanjenja mutnoće. S

obzirom na jednostavnost i ekonomičnost ovakvog postupka, kao i jednostavan *scale-up*, autori su ga predložili za primenu u velikim postrojenjima za obradu vode. Po istom ovom postupku, prečišćavan je ekstrakt u ispitivanjima koje su izveli Ghebremichael i saradnici (2009). Pri optimalnoj dozi, koja je za prečišćeni koagulant bila oko osam puta niža u odnosu na dozu sirovog ekstrakta, postignuto je smanjenje mutnoće u uzorku vode oko 97%.

Ndabigengesere i Narasiah (1998a) su predložili sledeću šemu dobijanja prečišćenih proteina iz *M. oleifera-e*:



**Slika 10.** Šema postupka dobijanja prečišćenih proteina iz *Moringa oleifera-e* (Ndabigengesere and Narasiah, 1998a)

Rezultati eksperimenata koagulacije sa ovako dobijenim prečišćenim proteinima su pokazali da je optimalna doza 50 do 100 puta niža od potrebne optimalne doze aluminijum-sulfata ili sirovog ekstrakta *M. oleifera-e*. Takođe, prilikom primene prečišćenih proteina ne dolazi do povećanja sadržaja organskih materija, fosfata i nitrata u obrađenoj vodi, za razliku od slučaja kada se za tretman koristi sirovi ekstrakt. Dobijeni prečišćeni protein u prahu je potpuno rastvoran u vodi i stabilan je. Pokazalo se da zadržava koagulacionu aktivnost na

istom nivou čak i nakon perioda skladištenja od godinu dana u plastičnoj boci, bez nekih specijalnih mera predostrožnosti.

### 2.3.4. Karakterizacija i mehanizam dejstva prirodnih koagulanata

Polimerni koagulanti mogu biti katjonski, anjonski ili nejonski. Agregacija čestica u rastvoru se može odvijati prema četiri klasična mehanizma koagulacije: kompresija dvojnog električnog sloja, *sweep* flokulacija, adsorpcija i neutralizacija naelektrisanja i adsorpcija i povezivanje mostovima. Kod polimernih koagulanata generalno preovlađuju poslednja dva mehanizma delovanja.

**Nirmali.** Ekstrakt semena nirmali drveta (*Strychnos potatorum*) sadrži anjonske polielektrolite koji destabilizuju čestice prisutne u vodi po mehanizmu povezivanja čestica mostovima (Yin, 2010). Ranija istraživanja su pokazala da ekstrakt semena takođe sadrži lipide, ugljene hidrate i alkalioide, koji sadrže slobodne –COOH i –OH grupe, koje doprinose koagulacionoj aktivnosti ekstrakta. Adinolfi i saradnici (1994) su utvrdili da smeša frakcije polisaharida ekstrahovana iz semena *S. potatorum* sadrži galaktomanan i galaktan koji su sposobni da redukuju do 80% mutnoće suspenzije kaolina. U svim slučajevima, galaktomanani su se sastojali od glavnog lanca 1,4-povezanih ostataka  $\beta$ -D-manopiranozila, koji nose terminalne  $\alpha$ -D-galaktopiranozil jedinice, povezane na nekim manoznim ostacima preko pozicija 0-6 (Corsaro et al., 1995). Iako mehanizam koagulacionog dejstva ekstrakta nirmali semena nije konkretno ispitivan, može se pretpostaviti da prisustvo velikog broja –OH grupa duž lanca galaktomanana i galaktana obezbeđuje mesta za adsorpciju, koja je doduše slaba, ali ih ima u dovoljnom broju, pa može doći do povezivanja čestica mostovima.

**Moringa oleifera.** Rad objavljen od strane Ndabigengesere i saradnika (1995) je prvi rad koji se bavio karakterizacijom i mehanizmom delovanja prirodnog koagulanta ekstrahovanog iz *M. oleifera*-e. U radu se sugerije da je aktivni koagulant dimerni katjonski protein molekulske mase 12 – 14 kDa i izoelektrične tačke između 10 i 11. Kao glavni mehanizam koagulacije navodi se adsorpcija i neutralizacija naelektrisanja. Nakon ovog rada, objavljen je niz međusobno kontradiktornih rezultata vezanih za prirodu aktivnog agensa prisutnog u ekstraktu *M. oleifera*-e. U radu Yin-a (2010) se navodi da su Gassenschmidt i saradnici utvrdili da je koagulacioni agens protein molekulske mase 6,5 kDa i izoelektrične tačke iznad 10, dok Ghebremichael i saradnici (2005) sugeriju da je to katjonski protein, čija je izoelektrična tačka veća od 9,6, a molekulska masa manja od 6,5 kDa. Okuda i saradnici (2001b) tvrde da aktivna komponenta u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom sa rastvorom soli nije ni protein, ni lipid, ni polisaharid, već organski polielektrolit molekulske mase oko 3 kDa. Iako rezultati većine istraživača govore u prilog tezi da je aktivni koagulacioni agens katjonski protein, otkriće Okude i saradnika (2001b) ne treba zanemariti, jer *Moringa* može sadržati veći broj neidentifikovanih koagulacionih agenasa, ali da je njihova koagulaciona sposobnost manja u odnosu na katjonski protein. Takođe, ovo ukazuje na to da aktivne koagulacione materije u vodenom ekstraktu i ekstraktu dobijenom ekstrakcijom sa rastvorom soli mogu biti različite prirode. Ghebremichael i saradnici (2005) u svom radu navode da postoji više od jedne familije proteina u semenu *M. oleifera*-e koji poseduju koagulacionu aktivnost i da različita istraživanja genoma širom sveta ukazuju da biljke tokom različitih stadijuma svog razvoja obrazuju različite proteine, što takođe može biti objašnjenje za različite rezultate istraživača vezane za prirodu aktivnih materija u ekstraktima *M. oleifera*-e.

U većini slučajeva, čestice prisutne u vodi su negativno naelektrisane i katjonski polielektroliti su tada veoma efikasni koagulanti. Dobro je poznato da u takvim slučajevima elektrostatičke interakcije obezbeđuju jaku adsorpciju i da dolazi do neutralizacije

naelektrisanja površine čestica, a čak može doći i do inverzije naelektrisanja (Bolto and Gregory, 2007). Koagulaciona sposobnost ekstrakta *M. oleifera*-e se može još poboljšati dodatkom katjona. U ispitivanju koje su sproveli, Okuda i saradnici (2001a) su utvrdili da dvovalentni katjoni ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) značajno poboljšavaju koagulacionu efikasnost ekstrakta *M. oleifera*-e, dok jednovalentni katjoni i anjoni ne utiču na koagulacionu aktivnost, pa autori iznose pretpostavku da dvovalentni katjoni bivaju adsorbovani na aktivne komponente, i na taj način formiraju nerastvornu mrežastu strukturu u koju suspendovane čestice kaolina bivaju uhvaćene, odnosno da dolazi do *sweep* koagulacije. Što se tiče mehanizma povezivanja suspendovanih čestica mostovima, malo je verovatno da aktivne komponente iz ekstrakta *M. oleifera*-e deluju na ovaj način s obzirom na to da je ovaj mehanizam zastupljen kod polimera velike molekulske mase (oko 1000 kDa i više), a da je molekulska masa proteina u ekstraktu *M. oleifera*-e prema dosadašnjim istraživanjima oko 13 kDa ili niža.

**Tanini.** Tanini je uopšten naziv za grupu polifenolnih jedinjenja. To su polimeri čija se molekulska masa kreće u opsegu od nekoliko stotina do nekoliko desetina hiljada daltona. Efikasnost tanina kao prirodnih koagulanata za obradu vode zavisi od njihove hemijske strukture. Prisustvo fenolnih grupa u taninima jasno ukazuje na njihovu anjonsku prirodu. Poznato je da fenolne grupe mogu lako da otpuste vodonikov jon, pa će efikasnost koagulacije taninima zavisiti od broja fenolnih grupa. Jeon i saradnici (2009) u svom radu, u kome su ispitivali primenu ekstrakta dobijenog iz semenki grožđa, bogatog polifenolima, za uklanjanje boja malahit zelene i kristal violet iz vode, kao mogući mehanizam dejstva navode sledeći: elektrostatičke interakcije između katjonskih boja i anjonskih polifenola su presudne za inicijalno obrazovanje kompleksa boje i koagulanta, pri čemu dolazi do neutralizacije naelektrisanja; nakon toga može doći do delimičnog povezivanja mostovima, što vodi obrazovanju flokula u koje se dalje mogu ugrađivati drugi molekuli.

**Kaktus.** Visoka koagulaciona sposobnost materija ekstrahovanih iz kaktusa iz roda *Opuntia* se pripisuje sluzi, koja predstavlja viskozni kompleks ugljenih hidrata, i koja je pohranjena u unutrašnjim i spoljašnjim jastučićima kaktusa. U ranijim ispitivanjima je utvrđeno da ova sluz sadrži ugljene hidrate kao što su L-arabinoza, D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza i galakturonsku kiselinu (Trachtenberg and Mayer, 1981; Sáenz et al., 2004). Miller i saradnici (2008) su izneli pretpostavku da je galakturonska kiselina najverovatnije aktivna materija koja daje koagulacionu sposobnost *Opuntia* spp. Takođe, oni sugerišu da je dominantni mehanizam koagulacije povezivanje mostovima. Iako nije rađeno opsežno istraživanje, može se pretpostaviti da se galakturonska kiselina (koja je glavni konstituent pektina u biljkama) nalazi uglavnom u polimernoj formi (kao poligalakturonska kiselina), što obezbeđuje „most“ na koji će se čestice iz vode adsorbovati. Struktura poligalakturonske kiseline ukazuje na njenu anjonsku prirodu, koja je posledica otpuštanja vodonikovih jona iz karboksilnih grupa.

### 2.3.5. Parametri koji utiču na efikasnost prirodnih koagulanata

**Početna mutnoća vode koja se tretira i doza koagulanta.** Početna mutnoća vode koja se tretira i primenjena doza prirodnog koagulanta su se pokazali kao veoma bitni faktori koji utiču na efikasnost koagulanta, što je i logično s obzirom na moguće mehanizme koagulacije – ukoliko je količina suspendovanih čestica (početna mutnoća vode) veća od optimalne (za datu dozu koagulanta), broj molekula koagulanta neće biti dovoljan za adsorpciju (i neutralizaciju naelektrisanja ili povezivanje preko mostova) na sve suspendovane čestice, pa se neće postići dovoljno dobro bistrenje, a ukoliko je količina suspendovanih čestica manja od optimalne, doći će do prepokrivanja površine čestica molekulima koagulanta, inverzije



naelektrisanja čestica i njihovog restabilizovanja u suspenziji, što ponovo daje nedovoljno dobro bistrenje.

Pritchard i saradnici (2010b) su ispitivali efikasnost vodenog ekstrakta *M. oleifera*-e na model vodama različitih početnih mutnoća, koje su se kretale u opsegu od 40 – 200 NTU. Bez obzira na početnu mutnoću model vode, pri niskim dozama koagulanta nije bilo koagulacione aktivnosti, ili je ona bila neznatna. Kako se povećavala doza koagulanta, koagulaciona aktivnost je rasla, sve do optimalne doze (30 – 55 mg/l u zavisnosti od model vode), kada je smanjenje mutnoće bilo maksimalno, a sa daljim povećanjem doze iznad optimalne, efikasnost bistrenja opada. Takođe, pri višim vrednostima početne mutnoće model vode postignuta je bolja koagulaciona aktivnost. Pri početnim mutnoćama nižim od 40 NTU postignuta je efikasnost od oko 50%, što je dosta niže od 90% postignutih u model vodi početne mutnoće 200 NTU. Kada se posmatra zavisnost između optimalne doze i početne mutnoće model vode, primećuje se da optimalna doza raste linearno sa povećanjem početne mutnoće.

I drugi istraživači navode slabiju efikasnost ekstrakta *M. oleifera*-e u vodama niže početne mutnoće (Muyibi and Evison, 1995b; Nkurunziza et al., 2009; Pritchard et al., 2009, Ghebremichael et al., 2009), što se objašnjava činjenicom da povećanje broja suspendovanih čestica dostupnih za adsorpciju u vodama veće inicijalne mutnoće doprinosi većoj efikasnosti uklanjanja mutnoće, i obrnuto. Muyibi i Okuofu (1995) su sugerisali da ekstrakt *Moringa oleifera*-e možda nije podoban koagulant za obradu slabo mutnih voda (uzorci vode iz tri površinska izvora vode u Nigeriji). Njihovi rezultati su potvrdili da se rezidualna mutnoća uzoraka povećava sa smanjenjem njihove početne mutnoće pri optimalnoj dozi ekstrakta. Maksimalna postignuta koagulaciona aktivnost za uzorke čija se početna mutnoća kretala u opsegu od 23 – 90 NTU je iznosila samo 50%. Okuda i saradnici (1999) su zaključili da primena ekstrakta *M. oleifera*-e za obradu vode prilikom pripreme vode za piće može biti neodgovarajuća s obzirom na to da je mutnoća sirove vode od koje se priprema voda za piće najčešće niska.

Ipak, ima rezultata koji govore u prilog tome da je ekstrakt *M. oleifera*-e jednako efikasan i u vodama male početne mutnoće, kao i u vodama velike početne mutnoće (Diaz et al., 1999).

Ekstrakti kestena (*Aesculus hyppocastanum*) i žira (*Quercus robur*) (Šćiban et al., 2009) su pokazali znatno veću efikasnost koagulacije u vodama male inicijalne mutnoće.

**pH vode koja se tretira.** S obzirom na to da su za sam mehanizam koagulacije ključne naelektrisane čestice, jasno je da će pH vrednost igrati značajnu ulogu tokom ovog procesa. U eksperimentima koje su izveli, Pritchard i saradnici (2010b) su utvrdili da je efikasnost koagulacije niska pri ekstremnim pH vrednostima. U svim sprovedenim testovima (u model vodama početne mutnoće 90, 130, 170 i 200 NTU) maksimalna koagulaciona aktivnost je postignuta oko neutralnog pH, na 6,5. Ovakav oblik krive koja daje zavisnost koagulacione aktivnosti od pH vrednosti model vode autori povezuju sa vrednostima izoelektričnih tački koagulanta i suspendovanih čestica (kaolin). Izoelektrična tačka za *M. oleifera*-u je na pH 10, a za kaolin na pH 2,8, što znači da je iznad ovih vrednosti njihov zeta potencijal negativan. Stoga su autori rada zaključili da između pH 2,8 i pH 10 različit predznak zeta potencijala *M. oleifera*-e i čestica kaolina dovodi do flokulacije, pri čemu će optimalna pH vrednost biti na sredini između pH 2,8 i 10, što je potvrđeno i rezultatom eksperimenta (eksperimentalno utvrđen optimalni pH je 6,5).

U eksperimentima uklanjanja boje u melasnoj džibri koagulacijom sa NaCl- i KCl- ekstraktom *M. oleifera*-e, Prasad (2009) je takođe utvrdio da je neutralna pH vrednost optimalna, dok je pri nižim i višim pH vrednostima (pH 4 i 9) efikasnost ekstrakta znatno

niža. Ipak, Ghebremichael i saradnici (2009) su utvrdili bolju efikasnost prečišćenog koagulanta iz ekstrakta *M. oleifera*-e dobijenog ekstrakcijom sa rastvorom NaCl na nižim pH vrednostima.

Šćiban i saradnici (2009) su ispitivali efikasnost uklanjanja mutnoće u model vodi koagulacijom sa vodenim ekstraktima kestena (*Aesculus hyppocastanum*) i žira hrasta (*Quercus robur*) na različitim pH vrednostima. pH 10 se pokazala kao optimalna pH vrednost i za jedan i za drugi ekstrakt.

Ipak postoje i rezultati koji ukazuju na to da pH vrednost ne utiče značajnije na koagulacionu aktivnost primenjenog koagulanta (Ndabigengesere i Narasiah, 1996; Diaz et al., 1999).

**Temperatura vode koja se tretira.** U eksperimentima koje su izveli, Pritchard i saradnici (2010b) su ispitivali i uticaj temperature na koagulacionu aktivnost u model vodama početne mutnoće u opsegu od 30 – 200 NTU. U ovim ogledima oni su utvrdili da, kako raste temperatura vode koja se tretira, raste i koagulaciona aktivnost. Dakle, može se zaključiti da niska temperatura utiče negativno na koagulaciju. U nekim od model voda koje su korišćene u ovom ogledu (model vode početne mutnoće 30 i 70 NTU) na niskim temperaturama (ispod 15°C) čak dolazi do povećanja rezidualne mutnoće u odnosu na početnu, što autori objašnjavaju činjenicom da je na ovim temperaturama koagulacija ograničena, pa ekstrakt *M. oleifera*-e, koji ima početnu mutnoću 8000 NTU, zaostaje u rastvoru (u vodi). Takođe, što je niža temperatura, viskozitet vode će biti veći, a to će uticati negativno na flokulaciju. Do sličnih rezultata u pogledu uticaja temperature na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta *M. oleifera*-e u model vodi su došli i Ndabigengesere i Narasiah (1996).

### 2.3.6. Rok trajanja prirodnih koagulanata

Vrlo je malo dostupnih podataka u literaturi o trajnosti prirodnih koagulanata. Većina autora navodi da su, radi prevencije efekata starenja, kao što su promena pH, viskoziteta i koagulacione aktivnosti usled mikrobiološke razgradnje organskih materija, za svaku grupu eksperimenata pripremali sveže ekstrakte, ili su ih eventualno čuvali do 3 dana na sobnoj temperaturi (Okuda et al., 1999).

Pritchard i saradnici (2010b) su ispitivali mogućnost skladištenja semena *M. oleifera*-e (nakon sakupljanja seme je osušeno, a zatim čuvano u mahunama, u hermetički zatvorenim poluprovodnim plastičnim kontejnerima) 12, 18 i 24 meseca. U tim ogledima je utvrđeno da seme staro 12 i 18 meseci još uvek sadrži aktivne komponente, dok seme staro 24 meseca pokazuje značajno smanjenje performansi.

Katayon i saradnici (2006) su takođe ispitivali mogućnost čuvanja semena *M. oleifera*-e. Samleveno seme je spakovano u zatvorene staklene boce i otvorene staklene čaše. Uzorci su čuvani na 3°C i na 28°C, a vreme čuvanja je iznosilo 1 mesec, 3 meseca i 5 meseci, nakon čega su iskorišćeni za pripremu ekstrakata. Ekstrakti dobijeni iz semena čuvanog 1 mesec su pokazali najveću koagulacionu aktivnost, a što je vreme skladištenja semena bilo duže, koagulaciona aktivnost ekstrakata dobijenih iz njega je opadala. Temperatura čuvanja i zatvorenost/otvorenost posuda u kojima je seme čuvano nisu značajnije uticali na koagulacione performanse dobijenih ekstrakata.

Prasad (2009) je ispitivao uticaj dužine i temperature skladištenja na koagulacione performanse ekstrakata *M. oleifera*-e dobijenih ekstrakcijom sa rastvorima NaCl i KCl. Ekstrakti su čuvani 1, 2, 3, 4, 5 i 6 dana na temperaturama 4°C i 30°C. Ekstrakti koji su čuvani na 30°C su zadržavali svoju aktivnost 3 dana, a nakon toga je njihova efikasnost naglo

opadala. Ekstrakti čuvani na 4°C su bili aktivni nešto duže – 5 dana, nakon čega je i njihova aktivnost opadala. Nisu primećene značajnije razlike u ponašanju ekstrakata dobijenih sa NaCl-om i KCl-om kao ekstragensima.

### 2.3.7. Primena prirodnih koagulanata za obradu različitih voda i otpadnih voda

Tokom ispitivanja mogućnosti uklanjanja natrijum lauril sulfata, jednog od najčešćih anjonskih surfaktanta, ekstraktom *M. oleifera-e*, Beltrán-Heredia i Sánchez-Martín (2009a) su postigli efikasnost od 80%. Oni su takođe utvrdili da postoji limit u ovom postupku jer se ne može postići rezidualna koncentracija surfaktanta niža od 5 ppm, a do sličnog zaključka su došli i Beltrán-Heredia i saradnici (2009) ispitujući uklanjanje natrijum dodecil benzen sulfonata iz vode primenom koagulanta na bazi tanina.

Beltrán-Heredia i saradnici (2009b) su utvrdili da se primenom koagulanta na bazi tanina (modifikovan kako bi dobio katjonski karakter) može postići do 80% uklanjanja boje Alizarin Violet 3R, a primenom ekstrakta *M. oleifera-e* do 95%. U istom radu, autori su ispitivali efikasnost uklanjanja i drugih boja (Indigo Karmin, Čikago Nebo Plava 6B, Kisela Crvena 88, Palatinska Brza Crna WAN, Eriohromcianin R i Metilen Plava) primenom ekstrakta *M. oleifera-e* i komercijalnog preparata na bazi modifikovanih tanina dobijenih iz biljke *Acacia mearnsii*. I jedan i drugi koagulant su pokazali zanemarljivu efikasnost uklanjanja Metilen Plave, što je bilo i za očekivati s obzirom da je to katjonska boja. Ekstrakt *M. oleifera-e* je veoma efikasno uklanjao azo boje (Čikago Nebo Plava 6B, Palatinska Brza Crna WAN i Kisela Crvena 88), a nešto slabije antrahinonsku boju Alizarin Violet 3R, ali je efikasnost ipak i dalje bila blizu 100%. Ako se izuzme Metilen Plava, ekstrakt *M. oleifera-e* je najviše problema imao sa uklanjanjem Eriohromcianin R, a koagulant na bazi tanina sa Indigo Karmin bojom. Pretpostavka autora je da uzrok ovakvom ponašanju leži u nelinearnoj strukturi i jedne i druge boje, koja može izazvati sterne smetnje, i da za koagulaciju mogu biti pogodniji linearni molekuli. Dalja ispitivanja u istom radu su rađena takođe sa ova dva koagulanta, ali samo sa bojom Alizarin Violet 3R. Prilikom ispitivanja kinetike koagulacije, utvrđeno je u slučaju oba koagulanta da se koagulacija odvija veoma brzo i da se ravnotežna preostala koncentracija boje u rastvoru postiže u prvih 5 minuta. Kao moguće objašnjenje autori navode kompleksan mehanizam koagulacije koji uključuje formiranje mrežaste strukture, proces za koji nije potrebno dugo vreme kontakta u poređenju sa drugim procesima, kao što je na primer sorpcija.

U drugom radu Beltrán-Heredia i Sánchez-Martín (2008) su ispitivali efikasnost uklanjanja azo boja primenom ekstrakta *M. oleifera-e* dobijenog ekstrakcijom sa rastvorom NaCl. Ispitujući kinetiku uklanjanja boje Čikago Nebo Plava 6B, oni su i u ovom slučaju utvrdili da je proces koagulacije veoma brz i da se ravnotežna preostala koncentracija boje dostiže za 5 minuta. S obzirom na pokazanu visoku efikasnost primenjenog ekstrakta u uklanjanju azo boja (do 99% uklanjanja Čikago Nebo Plave 6B), autori navode da ovakav postupak može imati prednost nad postupkom u kome se koriste tradicionalni koagulanti, i pored toga naglašavaju da se većina postupaka koji se koriste za uklanjanje boja sastoji iz dva stepena – adsorpcije i koagulacije, jer nijedan od ovih postupaka, ukoliko bi se primenjivao kao samostalan, nije dovoljno dobar – ili se ne postiže dovoljno dobro uklanjanje boja ili se moraju primeniti prevelike količine koagulanta.

U trećem radu, Beltrán-Heredia i saradnici (2009a) su uklanjali indigoidnu boju Karmin Indigo ekstraktom *M. oleifera-e* dobijenim ekstrakcijom sa rastvorom NaCl i postigli efikasnost do 80%.

Blackburn (2004) navodi da se biljnim gumama (guma iz rogača, guar guma, kasija guma) koje sadrže galaktomanane (nalaze se u velikoj količini u endospermu semena mnogih Leguminoza) može postići uklanjanje između 60% i 90% boja C.I. Reaktivna Crvena 238, C.I. Direktna Plava 22 i C.I. Kisela Plava 193.

Sanghi i saradnici (2006a, 2006b) su postigli značajno povećanje efikasnosti uklanjanja različitih boja obradom sintetički obojene vode sa malim dozama PACl u kombinaciji sa guar gumom (dobijenom iz *Cyamopsis tetragonolobus*) i gumama dobijenim iz semena biljaka *Ipomoea dasysperma* i *Cassia javahikai* u poređenju sa efikasnošću koja se postiže primenom samo PACl-a.

Pored obojenih efluenata, izvedeno je nekoliko istraživanja kako bi se ispitala mogućnost i celishodnost primene prirodnih koagulanata izolovanih iz biljaka za obradu drugih vrsta industrijskih otpadnih voda. Grupa autora – S. Bhatia, Z. Othman i A.L. Ahmad (Bhatia et al., 2007a; Bhatia et al., 2007b) – su ispitivali mogućnost primene vodenog ekstrakta *M. oleifera*-e za tretman otpadne vode od proizvodnje palminog ulja. Ovaj efluent je viskoznan, obojen, ima visok HPK i BPK, nisku pH vrednost i ispušta se sa povišenom temperaturom (75 – 85°C). Ovakve karakteristike ga čine nezgodnim materijalom za konvencionalne metode obrade, kako autori istraživanja navode. Istraživači su tokom ispitivanja postigli smanjenje sadržaja suspendovanih materija od 95% i smanjenje HPK za 52,2% u ovom efluentu primenom ekstrakta *M. oleifera*-e. Prilikom kombinovanja ekstrakta sa polimernim flokulantom (NALCO 7751, katjonski polielektrolit), poboljšano je uklanjanje suspendovanih materija, i iznosilo je 99,2%, ali je procenat smanjenja HPK bio niži u ovom slučaju nego prilikom samostalne primene ekstrakta.

Beltrán-Heredia i Sánchez-Martín (2009b) su primenili modifikovani koagulant na bazi tanina za uklanjanje teških metala ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$ ), čije rastvore su veštački dodavali u rečnu vodu. Tanini od kojih se modifikacijom dobija koagulant potiču iz biljke *Acacia mearnsii*, ekstrahovani su vodom i uglavnom se sastoje od flavonoidnih struktura sa prosečnom molekulskom masom 1,7 kDa. Pored ovih struktura, ekstrakt sadrži i različite gume i rastvorene soli. Modifikacija tanina se sastoji od reakcije koja uključuje tri reagensa: smeša tanina, aldehid (kao što je recimo formaldehid) i amino jedinjenje (kao što je recimo amonijak, primarni ili sekundarni amini). U izvedenim eksperimentima je postignuto uklanjanje  $\text{Cu}^{2+}$  do 90%,  $\text{Zn}^{2+}$  do 75% i  $\text{Ni}^{2+}$  do 70%.

Sánchez-Martín i koautori (2010b) su tretirali uzorke površinske vode (uzorci iz reke Guadiana, jugozapadna Španija) modifikovanim koagulantom na bazi tanina, koji je dobijen ekstrakcijom iz kore drveta *Schinopsis balansae*. Početna mutnoća uzoraka vode je iznosila  $80 \pm 5$  NTU, a tokom postupka koagulacije je postignuto smanjenje mutnoće do 80% pri relativno niskim dozama koagulant. Što se tiče uticaja koagulant na sadržaj organskih materija (izražen preko permanganatnog broja) u obrađenoj vodi, ona je imala nešto niži permanganatni broj u odnosu na sirovu (neobrađenu) vodu, a takođe se značajno smanjivao i broj mikroorganizama (ukupne koliformne bakterije, fekalne koliformne bakterije i fekalne streptokoke), što jasno ukazuje na to da se uklanjanjem mutnoće (koju u velikoj meri čine organske suspendovane materije) uklanja prirodna potpora mikroorganizama.

### 2.3.8. Poređenje efikasnosti prirodnih i tradicionalnih koagulanata

Ghebremichael i saradnici (2009) su poredili efikasnost prečišćenog koagulant ekstrahovanog iz semena *M. oleifera*-e i aluminijum-sulfata i feri-hlorida u obradi uzoraka rečne i kanalske vode. Sva tri koagulant su pokazala sličnu efikasnost prilikom uklanjanja mutnoće. Vizuelnim posmatranjem obrazovanih flokula su primećene značajne razlike u

smislu njihove veličine i brzine formiranja. Prečišćeni koagulant iz *M. oleifera*-e je obrazovao sitne flokule u vremenskom periodu od oko 5 minuta, sa malom brzinom taloženja, dok su koagulanti na bazi soli metala obrazovali velike flokule gotovo trenutno, što se pripisuje izdvajanju hidroksida. Ispitivanjem kvaliteta obrađene vode, utvrđeno je da prečišćeni koagulant iz *M. oleifera*-e nije uticao na njenu pH vrednost, ali je povećavao sadržaj ukupnih rastvorenih materija. S druge strane, koagulanti na bazi soli metala su snizili pH vrednost obrađene vode, ali nisu uticali na sadržaj ukupnih rastvorenih materija. Pri optimalnoj dozi prečišćenog koagulanta iz *M. oleifera*-e sadržaj ukupnih rastvorenih materija je povećan za 13% i njegova vrednost je još uvek bila ispod gornje granice propisane od strane Svetske zdravstvene organizacije, kako navode autori. Sličan uticaj koagulanta ekstrahovanog iz *M. oleifera*-e na pH i sadržaj ukupnih rastvorenih materija u tretiranoj vodi su utvrdili i Ndabigengesere i Narasiah (1998a).

Što se tiče zapremine mulja koji se obrazuje tokom koagulacije, javile su se značajne razlike u zavisnosti od primenjenog koagulanta. Prečišćeni koagulant iz *M. oleifera*-e je pri optimalnoj dozi proizveo 1,2 ml/l mulja, dok su aluminijum-sulfat i feri-hlorid pri optimalnim dozama proizveli 6 ml/l i 5 ml/l mulja, respektivno (Ghebremichael et al., 2009). Dakle, zapremina mulja prilikom primene neorganskih koagulanata je bila skoro četiri puta veća. Do sličnih podataka su došli i Ndabigengesere i saradnici (1995). Veća zapremina mulja koju proizvode neorganski koagulanti u poređenju sa koagulantom ekstrahovanim iz *M. oleifera*-e se objašnjava obrazovanjem taloga hidroksida metala prilikom njihove primene, koji predstavlja dodatni talog uz iztaložene suspendovane čestice. Pored toga, karakteristike mulja u smislu obezvodnjavanja su mnogo bolje pri primeni prirodnih koagulanata. Özacar i Şengil (2000) su utvrdili da mulj koji se dobija prilikom primene tanina kao pomoćnih koagulanata ima mnogo bolja svojstva prilikom obezvodnjavanja u poređenju sa muljem koji se obrazuje primenom samo aluminijum-sulfata.

Kada se radi o uklanjanju prirodnih organskih materija, što je takođe ispitivano u navedenom radu Ghebremichael i saradnika (2009), koagulanti na bazi soli metala su pokazali bolju efikasnost u poređenju sa koagulantom ekstrahovanim iz *M. oleifera*-e. Uklanjanje prirodnih organskih materija praćeno preko sadržaja DOC (*dissolved organic carbon*) pri primeni koagulanata na bazi soli metala se kretalo u opsegu od 15% do 20%, što je nisko u poređenju sa literaturnim podacima (na primer oko 35%, Qin et al., 2006). Smanjeno uklanjanje DOC se može pripisati tome što su dati uzorci vode sadržali uglavnom nehuminske organske materije i organske materije malih molekulskih masa, što predstavlja problem prilikom konvencionalnog tretmana, jer se ovakve materije na taj način teško uklanjaju. Maksimalne efikasnosti uklanjanja organskih materija, praćene preko UV<sub>254</sub> za koagulant iz *M. oleifera*-e, aluminijum-sulfat i feri-hlorid su iznosile 18%, 43% i 41%, respektivno. Viša efikasnost uklanjanja ove frakcije organskih materija je u skladu sa rezultatima drugih studija u kojima se sugerije da je koagulacija efikasna za uklanjanje aromatičnih/hidrofobnih frakcija prirodnih organskih materija. Rezultati su takođe pokazali da pri povećanju doze prečišćenog koagulanta iznad optimalne dolazi do naglog porasta DOC, dok se UV<sub>254</sub> nije povećavala, što se objašnjava time da prečišćeni koagulant sadrži samo protein, pa se prilikom predoziranja povećava samo sadržaj proteinske frakcije. Rezultati ispitivanja uklanjanja prirodnih organskih materija primenom koagulanta iz *M. oleifera*-e su ukazali na to da on redukuje sadržaj huminskih i fulvinskih frakcija prisutnih organskih materija.

Ispitivanje uklanjanja bakterija iz vode je pokazalo da je prečišćeni koagulant *M. oleifera*-e jednako efikasan kao i aluminijum-sulfat. Da bi se propratilo da li je uklanjanje posledica samo koagulacije/flokulacije, ili i nekog drugog mehanizma, broj bakterija je praćen i u izbistrenom delu i u mulju. Procenat uklanjanja bakterija u izbistrenom delu se povećavao sa povećanjem doze oba koagulanta (prečišćeni ekstrakt *M. oleifera*-e i

aluminijum-sulfat), pa je pretpostavljeno da je glavni mehanizam uklanjanja bakterija sličan onom kod uklanjanja mutnoće (koagulacija/flokulacija). Chow i saradnici (1999) su utvrdili da, kada se za obradu vode koja je sadržala cijanobakterije koristio aluminijum-sulfat, ćelije u izbistrenom delu i mulju nisu bile oštećene. U radu Ghebremichael-a i saradnika (2009) je ustanovljeno da uklanjanje bakterija primenom prečišćenog koagulanta iz *M. oleifera*-e nije posledica samo koagulacije/flokulacije, već i inhibicije rasta. Poređenje aluminijum-sulfata i *M. oleifera*-e je pokazalo da je za sličan procenat uklanjanja mutnoće redukcija broja bakterija bila veća prilikom primene *M. oleifera*-e. Ovakav rezultat je ukazivao na to da je, iako su oba koagulanta jednako uklonila mutnoću, broj živih bakterija u izbistrenom delu vode tretirane koagulantom iz *M. oleifera*-e bio niži, što ide u prilog tezi inhibicije rasta od strane ovog koagulanta. Ovakva pretpostavka je potvrđena i određivanjem broja bakterija u mulju. Broj bakterija u mulju koji nastaje prilikom tretmana vode sa prečišćenim koagulantom iz *M. oleifera*-e se smanjivao sa povećanjem doze koagulanta, dok se u slučaju primene aluminijum-sulfata broj bakterija u mulju povećavao kako se povećavala doza koagulanta, sugerišući da održivost ćelija nije bila ugrožena u prisustvu aluminijum-sulfata, a da *M. oleifera* inhibira rast bakterija.

U drugom delu rada Ghebremichael i saradnici (2009) su primenjivali prečišćeni koagulant iz *M. oleifera*-e kao pomoćni koagulant koagulantima na bazi soli metala, varirajući pri tome dozu i redosled dodavanja. Ispitane su tri kombinacije: 1) svaki koagulant samostalno, 2) dodavanje aluminijum-sulfata praćeno dodavanjem prečišćenog koagulanta i obrnuto, i 3) priprema smeše koagulanata pre dodavanja u vodu. Pokazalo se da redosled dodavanja koagulanata čini značajnu razliku, posebno u smislu uklanjanja DOC. Kada je prvo dodavan aluminijum-sulfat, a nakon njega prečišćeni ekstrakt, rezidualna mutnoća i DOC u tretiranoj vodi su bili znatno viši nego u slučaju kada je prečišćeni ekstrakt dodavan prvi, a za njim aluminijum-sulfat. Kada se aluminijum-sulfat doda kao prvi, većina prisutnih suspendovanih i koloidnih materija će biti destabilizovana, pa će prečišćeni koagulant biti izložen maloj mutnoći u vodi, kada opada njegova efikasnost. Kao posledica, prečišćeni koagulant zaostaje rastvoren u tretiranoj vodi vodeći povećanju rezidualnog DOC. S druge strane, kada se prečišćeni koagulant doda kao prvi, on će u vodi velike mutnoće formirati mikroflokule, koje će zatim biti uhvaćene i adsorbovane na talog hidroksida koji se formira nakon dodatka aluminijum-sulfata. U slučaju polielektrolita kao pomoćnih koagulanata, njihov dodatak nakon glavnog koagulanta je dovoljno efikasan zahvaljujući obrazovanju mostova između čestica, što funkcioniše dobro čak i u vodama male mutnoće. Predmešanje koagulanata (priprema smeše koagulanata pre dodavanja u vodu) nije dalo efikasnu koagulaciju. Iako autori nisu dali jasno objašnjenje za to, izneli su pretpostavku da dolazi do reakcija kompleksiranja između soli metala i proteina. Dodatak pomoćnog koagulanta je rezultovao boljim uklanjanjem mutnoće u poređenju sa samostalnom primenom aluminijum-sulfata. U proseku, uklanjanje mutnoće je povećano za 20%. Takođe, primenom pomoćnog koagulanta smanjena je potrebna količina aluminijum-sulfata za 50 – 75%. U slučaju uklanjanja DOC, dodatak *M. oleifera*-e pre aluminijuma je rezultovao najvećim uklanjanjem, od 23% do 40%.

U Kanou (Nigerija) sprovedeno je tromesečno ispitivanje primene *M. oleifera*-e kao primarnog koagulanta, i kao pomoćnog koagulanta aluminijum-sulfatu za tretman rečnih voda čija se mutnoća kretala u opsegu od 105 NTU do 350 NTU (Muyibi and Evison, 1996). Postignuto je uklanjanje 99% mutnoće pri optimalnim dozama, a potrebna zapremina aluminijum-sulfata je smanjena za 40%.

Muyibi i Alfugara (2003) su izveli ispitivanje na pilot postrojenju za obradu vode sa *M. oleifera*-om i aluminijum-sulfatom kao koagulantima. Početna mutnoća obrađivane vode je varirala u opsegu od 21 – 202 NTU, i redukovana je na 1,9 – 4,3 NTU kada je *M. oleifera*

korišćena kao primarni koagulant, a kada je korišćena kao pomoćni koagulant aluminijum-sulfatu, mutnoća je redukovana sa 27 – 394 NTU na 1,4 – 4,3 NTU.

Ghebremichael i saradnici (2005) su poredili koagulacione performanse sirovog vodenog ekstrakta *M. oleifera*-e i aluminijum-sulfata. Pri većoj početnoj mutnoći (250 – 300 NTU) model vode oba koagulanta su pokazala sličnu aktivnost, dok je pri nižoj početnoj mutnoći model vode (76 – 110 NTU) aluminijum-sulfat postigao veću brzinu taloženja i nižu rezidualnu mutnoću.

Bhatia i koautori (2007b) su primenili vodeni ekstrakt *M. oleifera*-e za tretman efluenta iz proizvodnje palminog ulja. U istom radu ispitana je i efikasnost aluminijum-sulfata. Ekstrakt *M. oleifera*-e se pokazao nešto boljim od aluminijum-sulfata kod uklanjanja suspendovanih materija, postigavši efikasnost od 95%, dok je aluminijum-sulfat uklonio 89% suspendovanih materija. Što se tiče uklanjanja HPK, oba koagulanta su imala sličnu efikasnost, oko 55%.

Prilikom skrininga uklanjanja boje Alizarin Violet 3R različitim koagulantima, Beltrán-Heredia i saradnici (2009b) su, između ostalih, primenili i aluminijum-sulfat i ekstrakt *M. oleifera*-e dobijen ekstrakcijom sa 1 M NaCl. Pri dozi od 100 mg/l, aluminijum-sulfat je neznatno redukovao količinu boje u model vodi (za oko 3%), dok je ekstrakt *M. oleifera*-e pri istoj dozi postigao efikasnost od 92%. Ovi rezultati se razlikuju od literaturnih podataka, posebno onih objavljenih u radu Blackburn-a (2004), ali mora se naglasiti da su primenjene doze veoma različite – 100 mg/l (Beltrán-Heredia et al., 2009b) nasuprot 10 000 mg/l (Blackburn, 2004).

U drugom radu, koji su objavili Beltrán-Heredia i Sánchez-Martín (2008), takođe je izveden preliminarni skrining uklanjanja azo boje Chicago Nebo Plava 6B primenom više različitih koagulanata, među kojima su bili i ekstrakt *M. oleifera*-e i aluminijum-sulfat. Aluminijum-sulfat je u tom slučaju postigao dobru efikasnost koja je bila slična efikasnosti ekstrakta *M. oleifera*-e (oko 95% za aluminijum-sulfat i oko 99% za ekstrakt *M. oleifera*-e), dok su ostali ispitivani koagulanti postigli znatno nižu efikasnost (nižu od 50%).

U studiji koju su objavili, Zhang i saradnici (2006) su uporedili efikasnost uklanjanja mutnoće i HPK primenom samlevenog kaktusa kao izvora prirodnih koagulanata, poliferosulfata i aluminijum-hlorida u različitim vodama. Prirodni koagulant je pokazao bolje koagulacione performanse od aluminijum-hlorida u model vodi, a poliferosulfat je pri optimalnoj dozi imao nešto malo bolju efikasnost od koagulanta iz kaktusa, ali je voda bila intenzivno žuto obojena. Tokom obrade vode koja predstavlja izvor za pripremu vode za piće, najveću efikasnost uklanjanja mutnoće je postigao aluminijum-hlorid, zatim poliferosulfat i na kraju kaktus, ali sva tri koagulanta su imala visoku efikasnost, iznad 93%. Takođe, veoma visoku efikasnost, preko 99%, su pokazali poliferosulfat i kaktus u uklanjanju mutnoće iz morske vode velike početne mutnoće (980 NTU).

### 2.3.9. Pasulj kao mogući izvor prirodnih koagulanata

Pasulj (*Phaseolus vulgaris*) je jednogodišnja biljka, koja ima plod u obliku mahune unutar koje se nalazi seme bubrežastog oblika. Najpoznatija je i najrasprostranjenija mahunarka u svetu, visoke hranljive i biološke vrednosti. Prema sistematizaciji biljaka pripada familiji *Fabaceae*, rodu *Phaseolus* i vrsti *Phaseolus vulgaris*. Familija *Fabaceae* obuhvata 600 rodova i oko 13 000 vrsta. *Phaseolus vulgaris* je vrsta kod koje je poznato oko 500 varijeteta.

Prosečan hemijski sastav zrna pet domaćih sorti pasulja prikazan je u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Prosečan hemijski sastav pasulja (Tepić et al., 2007)

Parametar:	Minimalno	Maksimalno
Suva materija (%)	90,06	93,30
Pepeo (%)	3,15	3,70
Ukupni šećeri* (%)	5,80	7,57
Skrob (%)	51,00	53,71
Ulje (%)	0,71	1,02
Celuloza (%)	3,47	4,11
Kiselost (%)	0,52	0,59
Fitinska kiselina (mg/g)	7,20	13,20
Proteini (%)	21,90	23,75

\* određivani su glukoza, fruktoza i saharoza

Mahunarke su najbolji biljni izvor proteina. Rezultati brojnih istraživanja su potvrdili da jedinjenja iz biljnog materijala koja poseduju koagulacionu aktivnost između ostalih mogu biti i proteini (Ndabigengesere et al., 1995; Ghebremichael et al., 2005, 2006; Yin, 2010), pa se, s obzirom na visok sadržaj proteina u zrnu pasulja, ova biljka smatra mogućim komercijalnim izvorom prirodnih koagulanata.

Pored proteina, i polisaharidi su jedinjenja koja poseduju koagulacionu aktivnost (Yin, 2010; Adinolfi et al., 1994; Miller et al., 2008; Pal et al., 2005). Ugljeni hidrati čine 67,23 – 69,62% semena pasulja izraženo na suhu materiju. U okviru njih je najzastupljeniji skrob, koji čini 60 – 80% ukupnih ugljenih hidrata, dok ostatak čine vlakna. Rastvorljiva vlakna su pektin, gume i neke hemiceluloze, i ona čine 92 – 100% ukupnih vlakana semena pasulja, dok nerastvorljiva vlakna, kao što su lignin, celuloza i preostale hemiceluloze, čine samo mali deo dijetetskih vlakana u pasulju. (Krčmar, 2008)

Lipidi su zastupljeni u manjim količinama, od 1 do 3%. Preovlađuju neutralni lipidi, a odnos neutralnih prema polarnim (fosfolipidima) je 60:40. (Krčmar, 2008).

Fosfor u pasulju je u velikoj meri prisutan u obliku fitinske kiseline. Fitinska kiselina se nalazi u ljusci mnogih žitarica i leguminoza i može da vezuje dvovalentne jone, i da formira komplekse sa proteinima, što može imati uticaja na koagulacionu sposobnost ekstrakta pasulja.



### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. EKSTRAKCIJA PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA

Seme pasulja (sorta Gradištanac) se samelje na laboratorijskom mlinu i proseje kroz sito prečnika otvora 0,4 mm. Određena količina sitnije frakcije se suspenduje u odgovarajućoj zapremini ekstragensa, i meša 10 minuta na magnetnoj mešalici (na sobnoj temperaturi) kako bi se ekstrahovale aktivne materije. Nakon toga suspenzija se profiltrira kroz filter papir Macherey-Nagel MN 651/120. Tako dobijeni filtrati, koji se nazivaju sirovi ekstrakti, su do upotrebe čuvani u zamrzivaču.

#### 3.2. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA

##### 3.2.1. Prečišćavanje prirodnih koagulanata jonoizmenjivačkom hromatografijom

###### 3.2.1.1. Prečišćavanje prirodnih koagulanata katjonitima Amberlite™ IR 120Na i Wofatit (šaržno)

Pre prečišćavanja proteina na katjonskim jonoizmenjivačkim smolama, izvedeno je njihovo izdvajanje taloženjem dodatkom soli. Taloženje proteina iz sirovog ekstrakta se izvodi njihovim isoljavanjem, odnosno smanjuje se njihova rastvorljivost dodavanjem amonijum-sulfata do 80% zasićenja (561 g/l) na hladno (Adamović, 2010). Dobijeni talog se od rastvora odvaja centrifugiranjem na 3000 o/min u trajanju od 10 minuta. Talog se odvoji od supernatanta dekantovanjem, i resuspenduje u 0,1 mol/l fosfatnom puferu (pH 7). Kako bi se iz tako dobijenog rastvora proteina uklonili joni soli, on se stavlja na dijalizu u celofanskoj vrećici (čiji je *cut-off* 12 – 14 kDa) nasuprot dejonizovanoj vodi. Dijaliza se izvodi na +4°C uz blago mešanje u toku 24 h, pri čemu se dejonizovana voda u koju je uronjena vrećica povremeno zamenjuje svežom dejonizovanom vodom. Nakon završene dijalize, dobija se suspenzija iz koje su uklonjeni joni soli, i koja se naziva dijalizat.

Dijalizat dobijen po prethodno opisanoj proceduri se razblažuje 0,1 mol/l fosfatnim puferom odgovarajuće pH vrednosti do postizanja određene početne koncentracije proteina, a zatim se meša u šaržnim uslovima rada brzinom od 80 o/min sa datom jonoizmenjivačkom smolom u odnosu 1:1, tokom 30 minuta. Ostatak nakon jonske izmene se odvaja od jonoizmenjivačke smole, koja se zatim ispira 0,1 mol/l fosfatnim puferom odgovarajuće pH vrednosti u odnosu 1:1, u trajanju od 30 minuta. Nakon završenog ispiranja, rastvor od ispiranja se odvaja od smole. Količina proteina vezanih po jedinici zapremine jonoizmenjivačke smole ( $q$ ) i efikasnost vezivanja ( $E$ ) se računaju po jednačinama (2) i (3):

$$q = (C_0 - C)/V \quad (2)$$

$$E(\%) = (C_0 - C) \cdot 100/C_0 \quad (3)$$

gde je:  $C_0$  – početna koncentracija proteina u rastvoru [mg/ml],

$C$  – preostala koncentracija proteina u rastvoru nakon njihovog vezivanja [mg/ml], i

$V$  – zapremina smole [ml] dodata u 1 ml rastvora proteina.

Eluiranje vezanih proteina se izvodi sukcesivnim dodavanjem rastvora NaCl rastuće koncentracije (0,5 mol/l, 1 mol/l, 1,5 mol/l i 2 mol/l) u zapreminskom odnosu jonoizmenjivačka smola : rastvor NaCl = 1:1, i njihovim mešanjem brzinom od 80 o/min u trajanju od 30 minuta.

### **3.2.1.2. Prečišćavanje prirodnih koagulanata anjonitom Amberlite™ IRA 958Cl (šaržno)**

Pre prečišćavanja proteina na anjonitu Amberlite™ IRA 958Cl, izvedeno je njihovo izdvajanje taloženjem. Taloženje proteina iz sirovog ekstrakta pasulja i dobijanje dijalizata izvedeno je po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1., s tom razlikom što je talog resuspendovan u 0,01 mol/l fosfatnom puferu (pH 7).

Vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu se izvodi tako što se dijalizat razblaži odgovarajućim puferom do određene početne koncentracije proteina, a zatim se meša na magnetnoj mešalici brzinom od 80 o/min sa jonoizmenjivačkom smolom u odgovarajućem zapreminskom odnosu. Jonoizmenjivačka smola se prethodno uravnoteži mešanjem sa onim puferom kojim je vršeno razblaživanje dijalizata u zapreminskom odnosu pufer : smola = 1:1, u toku 15 minuta. Po isteku vremena predviđenog za vezivanje, određuje se količina proteina preostala u rastvoru. Količina proteina vezanih po jedinici zapremine jonoizmenjivačke smole ( $q$ ) se računa po formuli (2), a efikasnost vezivanja ( $E$ ) po formuli (3).

Nakon vezivanja proteina za smolu, ostatak rastvora se odvoji, a smola se ispira 15 minuta sa 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) pri zapreminskom odnosu smola : pufer = 1:1. Ostatak od ispiranja se odvoji dekantovanjem. Proteini koji su se vezali za smolu se sukcesivno eluiraju (pri brzini mešanja 80 o/min) rastvorima natrijum-hlorida rastuće koncentracije (0,5 mol/l, 1 mol/l, 1,5 mol/l i 2 mol/l) tako što se jonoizmenjivačka smola u prvom koraku meša tokom 20 minuta sa rastvorom NaCl najniže koncentracije, pri zapreminskom odnosu smola : rastvor NaCl = 1:1, a zatim se razdvajaju dekantovanjem rastvora NaCl. Potom se jonoizmenjivačka smola pri istim uslovima meša sa sledećim rastvorom NaCl u nizu i postupak se ponavlja.

### **3.2.1.3. Prečišćavanje prirodnih koagulanata anjonitom Amberlite™ IRA 900Cl (šaržno)**

Pre prečišćavanja proteina iz sirovog ekstrakta pasulja na anjonitu Amberlite™ IRA 900Cl izvedeno je njihovo izdvajanje taloženjem amonijum-sulfatom iz sirovog ekstrakta i dijaliza po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.2.

Nakon pripreme dijalizata izvedeni su eksperimenti za određivanje optimalnih uslova za vezivanje proteina u šaržnim uslovima rada: pH fosfatnog pufera kojim se razblažuje dijalizat, koncentracije fosfatnog pufera, zapreminskog odnosa mešanja jonoizmenjivačke smole i rastvora proteina i vremena kontakta, i određen je kapacitet jonoizmenjivača. Kada su određeni optimalni uslovi za vezivanje proteina iz ekstrakta pasulja na jonoizmenjivačku smolu, izvedeno je njihovo vezivanje iz rastvora u kome je njihova početna koncentracija podešena razblaživanjem dijalizata sa 0,01 mol/l fosfatnim puferom pH 7, pri sledećim uslovima: zapreminski odnos smola : rastvor proteina = 1:1, vreme kontakta 30 minuta, brzina mešanja 80 o/min. Nakon vezivanja proteina, smola je ispirana 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) u zapreminskom odnosu smola : pufer = 1:1, 30 minuta uz mešanje od 80 o/min.

Eluiranje proteina koji su se vezali za smolu se izvodi sukcesivno rastvorima natrijum-hlorida rastuće koncentracije (0,5 mol/l, 1 mol/l, 1,5 mol/l i 2 mol/l) tako što se

jonoizmenjivačka smola meša sa odgovarajućim rastvorom NaCl u zapreminskom odnosu 1:1 tokom 30 minuta, zatim se smola odvaja od eluata i meša sa sledećim rastvorom NaCl.

Nakon ispitivanja ovako dobijenih eluata, a kako bi se preciznije odredile koncentracije rastvora NaCl kojima će biti izvedeno eluiranje proteina sa jonoizmenjivačke smole u šaržnim uslovima, u sledećim eksperimentima je prvo izvedeno vezivanje proteina za jonoizmenjivač u koloni, a zatim i njihovo eluiranje u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl, na osnovu čega je dobijen elucioni dijagram. Elucioni dijagram je poslužio kao osnova za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se izvesti eluiranje nakon vezivanja proteina u šaržnim uslovima rada. Vezivanje proteina je izvedeno na sledeći način. Pre izvođenja same hromatografije, jonoizmenjivačka smola (10 ml) u koloni (laboratorijska kolona prečnika 8 mm) se uravnoteži ispiranjem sa 2 ZS (ZS – zapremina sloja jonoizmenjivača u koloni) 0,01 mol/l fosfatnog pufera (pH 7), koji se zatim ostavi da stoji u koloni još 10 minuta po ispiranju smole. Nakon uravnoteženja jonoizmenjivačke smole, na nju se nanosi određena zapremina dijalizata. Potom se kroz kolonu propušta 0,01 mol/l fosfatni pufer (pH 7) protokom 1 ml/min, koji sa sobom nosi proteine kroz sloj smole. Tom prilikom dolazi do njihovog vezivanja, a oni proteini koji se nisu vezali za jonoizmenjivač bivaju iznešeni iz kolone. Ispiranje se izvodi sve dotle dok u puferu koji izlazi iz kolone više ne bude proteina. Nakon završenog postupka vezivanja, pristupa se eluiranju vezanih proteina koje je izvedeno kontinualno u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl (0 mol/l – 1 mol/l) u 0,01 mol/l fosfatnom puferu (pH 7), pri protoku od 1 ml/min. Na izlazu iz kolone se sakupljaju frakcije određene zapremine, i u njima određuje koncentracija proteina, kao i njihova koagulaciona aktivnost. Dobijeni podaci daju elucioni dijagram koji predstavlja osnovu za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se u sledećem eksperimentu nakon vezivanja proteina po šaržnom postupku, izvesti njihovo stupnjevito eluiranje.

#### **3.2.1.4. Prečišćavanje prirodnih koagulanata anjonitom Amberlite™ IRA 900Cl (kolonska hromatografija)**

Prečišćavanje proteina iz sirovog ekstrakta pasulja taloženjem dodatkom amonijum-sulfata i dijalizom izvedeno je po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.2.

Pre izvođenja same hromatografije, jonoizmenjivačka smola (10 ml) u koloni (laboratorijska kolona prečnika 8 mm) se uravnoteži ispiranjem sa 2 ZS 0,05 mol/l fosfatnog pufera (pH 7,5), koji se zatim ostavi da stoji u koloni još 10 minuta po ispiranju smole. Nakon uravnoteženja jonoizmenjivačke smole, na nju se nanosi određena zapremina dijalizata. Potom se kroz kolonu propušta 0,05 mol/l fosfatni pufer (pH 7,5) protokom 1 ml/min, koji sa sobom nosi proteine kroz sloj smole. Tom prilikom dolazi do njihovog vezivanja, a oni proteini koji se nisu vezali za jonoizmenjivač bivaju iznešeni iz kolone. Ispiranje se izvodi sve dotle dok u puferu koji izlazi iz kolone više ne bude proteina. Nakon završenog postupka vezivanja, pristupa se eluiranju vezanih proteina koje je izvedeno u različitim gradijentima koncentracije rastvora NaCl u 0,05 mol/l fosfatnom puferu (pH 7,5), pri protoku od 1 ml/min. Na izlazu iz kolone se sakupljaju frakcije određene zapremine, i u njima određuje koncentracija proteina, kao i njihova koagulaciona aktivnost. Dobijeni podaci daju elucioni dijagram koji predstavlja osnovu za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se u sledećem eksperimentu nakon vezivanja proteina po istom postupku, izvesti njihovo stupnjevito eluiranje u koloni. Stupnjevito eluiranje je izvedeno sukcesivno sa po 3 ZS pomenutih rastvora NaCl.

### 3.2.2. Frakcionisanje prirodnih koagulanata iz zrna pasulja ultrafiltracijom

Ultrafiltracija je izvedena u čaši za ultrafiltraciju Millipore Stirred Ultrafiltration Cell Model 8200 na sirovom ekstraktu pasulja dobijenom po prethodno opisanoj proceduri ekstrakcijom sa destilovanom vodom kao ekstragensom pri ekstrakcionom odnosu 1:20. Za ultrafiltraciju su korišćene membrane čiji je *molecular weight cut off* (MWCO) iznosio 5000 Da, 10000 Da i 30000 Da, a uslovi pod kojima je ona izvedena su sledeći:

- pritisak inertnog gasa (azota): 2,5 – 4 bar,
- primenjeno je umereno mešanje na magnetnoj mešalici (oko 80 o/min),
- početna zapremina rastvora za filtraciju: 150 ml, i
- krajnja zapremina retentata: 30 ml.

Kako su korišćene tri membrane različitih prečnika pora, dobijene su četiri frakcije prirodnih koagulanata:

- I frakcija – koagulanti molekulske mase  $M < 5000$  Da,
- II frakcija – koagulanti molekulske mase  $5000 \text{ Da} < M < 10000$  Da,
- III frakcija – koagulanti molekulske mase  $10000 \text{ Da} < M < 30000$  Da, i
- IV frakcija – koagulanti molekulske mase  $M > 30000$  Da.

U prvoj fazi sirovi ekstrakt pasulja zapremine 150 ml je filtriran kroz membranu *cut off*-a od 30000 Da. Filtracija je vođena tako da je na kraju zapremina retentata iznosila 30 ml. Ovako dobijeni retentat je razblažen do početne zapremine od 150 ml dodatkom destilovane vode i označen kao **IV** frakcija.

U sledećoj fazi, permeat dobijen u prethodnoj fazi je razblažen do početne zapremine od 150 ml dodatkom destilovane vode. Nakon toga je filtriran kroz membranu *cut off*-a od 10000 Da. Filtracija je vođena tako da je na kraju zapremina retentata iznosila 30 ml. Ovako dobijeni retentat je razblažen do početne zapremine od 150 ml dodatkom destilovane vode i označen kao **III** frakcija.

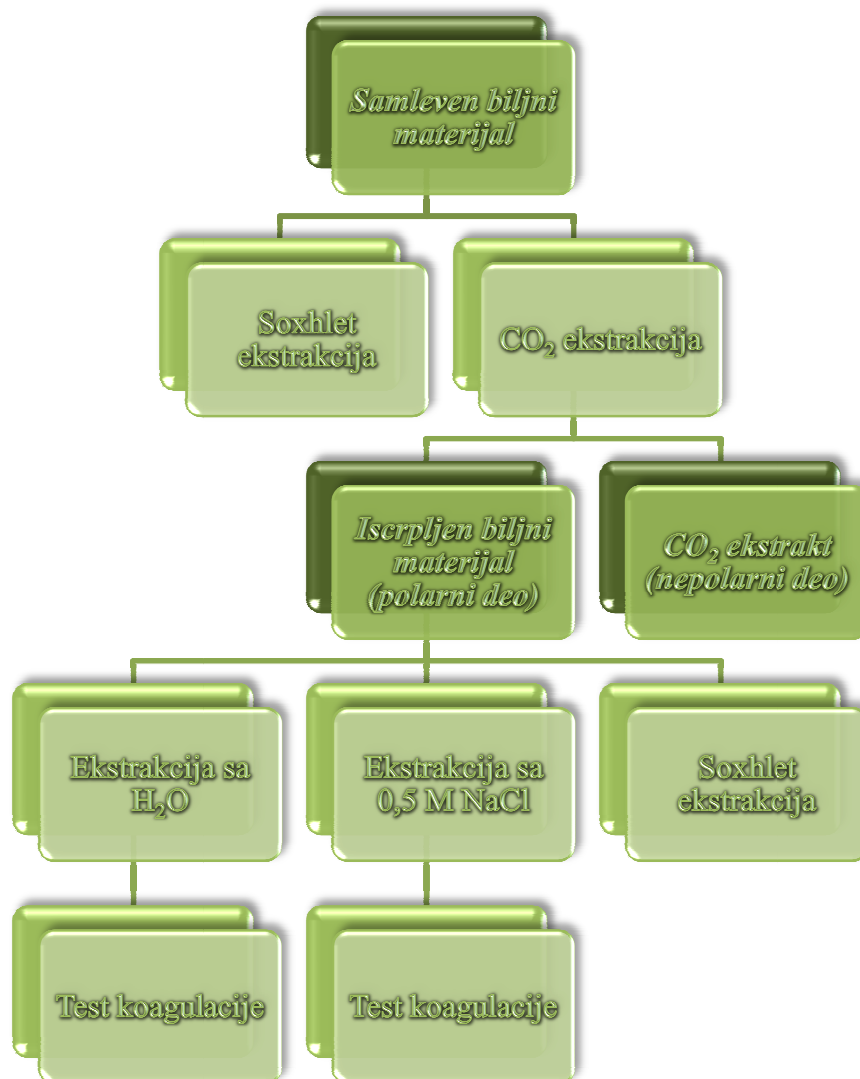
U trećoj fazi, permeat sakupljen u drugoj fazi je razblažen do početne zapremine od 150 ml dodatkom destilovane vode, i nakon toga filtriran kroz membranu *cut off*-a od 5000 Da. Na kraju ove faze zapremina retentata je takođe iznosila 30 ml. Ovako dobijeni retentat je razblažen do početne zapremine od 150 ml dodatkom destilovane vode i označen je kao **II** frakcija.

Permeat dobijen u trećoj fazi je takođe razblažen destilovanom vodom do zapremine 150 ml i na ovaj način je dobijena **I** frakcija.

### 3.2.3. Izdvajanje nepolarnih komponenti iz zrna pasulja ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> u superkritičnom stanju

Zrno pasulja sadrži različite sastojke. Prilikom ekstrakcije vodom ili vodenim rastvorima soli, dobija se ekstrakt koji sadrži supstance koje su polarne. To su u najvećoj meri ugljeni hidrati i proteini. Ekstrakcijom ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju iz zrna pasulja izdvojene su nepolarne komponente. Preostale nepolarne komponente iz iscrpljenog pasulja, kao i nepolarne komponente iz pasulja iz koga nije izvršeno izdvajanje lipidnih komponenti superkritičnom ekstrakcijom, ekstrahovane su Soxhlet metodom, primenom heksana kao rastvarača, kako bi se došlo do podataka o prinosu superkritične ekstrakcije.

Nakon završene superkritične ekstrakcije, izvedena je ekstrakcija prirodnih koagulanata iz iscrpljenog ostatka pasulja destilovanom vodom i 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri ekstrakcionom odnosu 1:20. Dobijeni ekstrakti su primenjeni kao koagulanti u testovima koagulacije. Šematski prikaz toka eksperimentalnog postupka je dat na Slici 11.



**Slika 11.** Šema eksperimentalnog postupka dobijanja prirodnih koagulanata iz zrna pasulja nakon izdvajanja nepolarnih materija ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> u superkritičnom stanju

### 3.2.3.1. Određivanje stepena usitnjenosti i ujednačenosti veličina čestica biljnog materijala

Biljni materijal koji se podvrgava ekstrakciji mora biti usitnjen do određenog stepena. Postupkom usitnjavanja se narušava struktura biljnog tkiva, odnosno skraćuje put difuzije aktivnih materija i povećava površina za razmenu mase. U ovom radu pasulj je samleven na laboratorijskom mlinu i na taj način pripremljen za dalji rad.

Stepen usitnjenosti biljnog materijala označava se arapskim brojevima u zagradi iza naziva biljnog materijala ili preparata. Definisani su preko veličine srednjeg prečnika čestica

( $d$ ), koji se određuje prema postupku opisanom u Praktikumu hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda (Lepojević, 2000), i izračunava iz izraza:

$$\frac{100}{d} = \sum \left( \frac{m_i}{d_i} \right) \quad (4)$$

gde je:  $d$  – srednji prečnik čestica [mm],  
 $m_i$  – maseni procenat  $i$ -tih čestica [%],  $i$   
 $d_i$  – srednji prečnik  $i$ -te frakcije [mm].

Za određivanje granulometrijskog sastava usitnjenog biljnog materijala primenjen je set sita proizvođača Erweka Apparatebau GmbH (Tabela 2).

**Tabela 2.** Oznaka i veličina otvora sita proizvođača Erweka

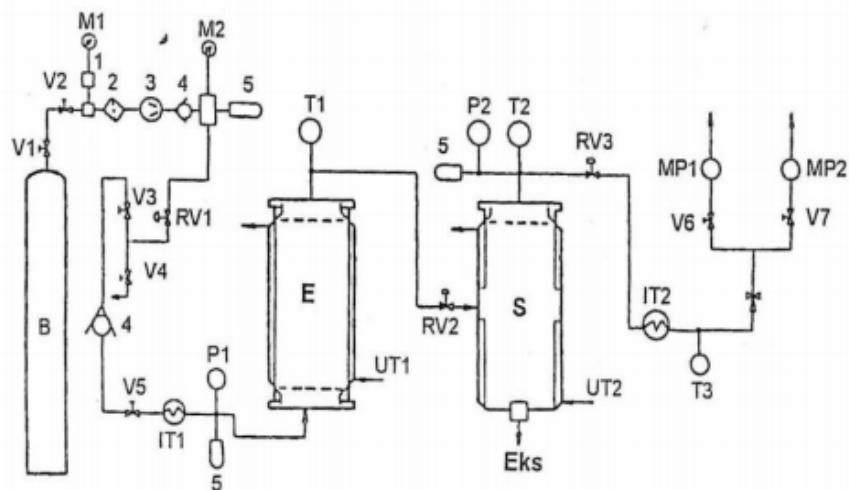
Oznaka sita:	Veličina otvora sita (mm):
0	10
1	4
2	3,15
3	2
4	0,8
5	0,315
6	0,16
7	0,1

Na osnovu rezultata i formule (4) izračunat je srednji prečnik čestica pasulja  $d_{sr} = 0,1075$  mm.

### 3.2.3.2. Ekstrakcija lipidnih materija

**Ekstrakcija ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju.** Za ekstrakciju nepolarnih materija iz samlevenog uzorka pasulja korišćena je aparatura za ekstrakciju fluidima u superkritičnom stanju (HPEP, NOVA Swiss 565.0156, Effertikon), čiji su osnovni delovi prikazani šematski na Slici 12 (Zeković, 1998). Komercijalni ugljen-dioksid (Messer) je korišćen kao ekstragens.

Masa uzorka u ekstraktoru je iznosila 150 g. Ekstrakcija je rađena na pritiscima od 100, 200 i 300 bar i temperaturama od 40, 45 i 50°C, pri protoku ugljen-dioksida od 97,725 l/h. Vreme ekstrakcije je iznosilo 3 sata. Kinetika ekstrakcije je praćena merenjem prinosa ekstrakcije nakon 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta. Pritisak u separatoru je iznosio 15 bar, a temperatura 23°C. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su preneti u staklene bočice, zatvoreni i čuvani na temperaturi od +4°C, kako bi se sprečila bilo kakva mogućnost degradacije aktivnih komponenti.



**Slika 12.** Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom: 1 – merni konektor; 2 – filteri; 3 – kompresor sa dijafragmom (pritisak u opsegu do 1000 bar); 4 – kontrolni ventil; 5 – sigurnosni ventil; B – boca sa ugljen-dioksidom; V – ventil; M – manometar; RV – regulacioni ventil; IT – izmenjivač toplote; P – manometar; E – ekstraktor (unutrašnja zapremina od 200 ml;  $P_{\max} = 200$  bar); T – termometar; UT – ultratermostat; S – separator (unutrašnja zapremina od 200 ml;  $P_{\max} = 250$  bar); Eks – ekstrakt; MP – merač protoka

**Soxhlet ekstrakcija.** Određivanje nepolarnih materija preostalih u sirovini nakon superkritične ekstrakcije ugljen-dioksidom izvedeno je primenom metode po Soxhlet-u (Wrolstad, 2001). Ekstrakcija je izvedena n-heksanom kao rastvaračem iz 50 g čvrstog materijala – iscrpljene droge, dobijene nakon superkritične ekstrakcije. Nakon sprovedene ekstrakcije, otparavanje rastvarača se izvodi rotacionim vakuum uparivačem na  $40^{\circ}\text{C}$ , a zatim meri masa i računa količina ekstrahovanih lipidnih materija prema formuli:

$$m_l = m_b - m_{pb} \quad (5)$$

gde je:  $m_l$  – masa ekstrahovanih lipidnih materija [g],  
 $m_b$  – masa balona sa ekstrahovanim lipidima [g], i  
 $m_{pb}$  – masa praznog balona [g].

Na isti način se odredi i sadržaj lipidnih materija u samlevenom pasulju u kome nije izvedena superkritična ekstrakcija.

Kod Soxhlet ekstrakcije potrebno je da je procenat vlage u uzorku manji od 10%, što je određeno gravimetrijski pre početka ekstrakcije.

### 3.3. MODEL VODA

Koagulaciona aktivnost prirodnih koagulanata je (sem u poglavlju 4.11., gde su u ispitivanju koagulacione aktivnosti korišćene realne otpadne vode) ispitivana na model vodi, tj. sintetički mutnoj vodi. Početna 1% suspenzija kaolina se priprema tako što se kaolin dobro usitni u keramičkom avanu, proseje kroz sito sa otvorima 0,4 mm, i sitnija frakcija zatim disperguje u vodovodskoj vodi u količini 10 g/l. U ogleđima izvedenim u okviru poglavlja 4.9. 1% suspenzija kaolina je umesto sa vodovodskom vodom pripremana dodatkom destilovane vode, a takođe i model voda, po istoj ovoj proceduri. 1% suspenzija meša se 60 minuta na magnetnoj mešalici, kako bi se postiglo ravnomerno dispergovanje čestica kaolina,

nakon čega se ostavlja da odstoji 24 h radi postizanja njegove kompletne hidratacije. Za pripremanje sintetički mutne vode u većini slučajeva se koristi vodovodska voda jer sadrži jone kalcijuma i druge dvovalentne katjone, koji sa dodatim koagulantom mogu da obrazuju mrežastu strukturu u koju se upliću čestice kaolina i obrazuju aglomerate koji zbog svoje težine podležu sedimentaciji. Model voda se priprema neposredno pre izvođenja testova koagulacije dodavanjem određene zapremine 1% suspenzije kaolina u vodovodsku vodu (sem u eksperimentima izvedenim u okviru poglavlja 4.9., gde se umesto vodovodske vode koristi destilovana voda), kako bi se dobila model voda određene početne mutnoće. Vodovodska voda korišćena za pripremu model vode je sledećeg sastava:

**Tabela 3.** Sastav vodovodske vode korišćene za pripremu model vode

Parametar:	Vrednost:
Mutnoća (NTU)	0,07
Elektroprovodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	645
pH	7,28
Ukupna tvrdoća ( $^{\circ}\text{N}$ )	17,1
Kalcijum (mg/l)	83,2
Magnezijum (mg/l)	19,9
Hloridi (mg/l)	30,0
Sulfati (mg/l)	61,5
Nitrati (mg/l)	2,8
Permanganatni broj (mg $\text{KMnO}_4/\text{l}$ )	6,7

Podešavanje pH vrednosti model vode se takođe izvodi neposredno pre testova koagulacije dodavanjem rastvora NaOH ili HCl u zavisnosti od toga koja pH vrednost se želi postići.

### 3.4. OTPADNE VODE

Pored ispitivanja efikasnosti prirodnih koagulanata dobijenih iz pasulja u model vodi, izvedeno je i ispitivanje njihove efikasnosti u različitim otpadnim vodama. Otpadne vode su dobijene nakon laboratorijske proizvodnje bioetanola, pri čemu su hranljive podloge za proizvodnju bioetanola pripremljene od međuproizvoda tokom proizvodnje šećera – ekstrakcionog soka, retkog soka i gustog soka, i nus-proizvoda – melase (obezbeđeni iz fabrika šećera u Crvenki i Senti, Srbija, tokom sezone 2007/2008 godina). Ovi sokovi su razblaženi destilovanom vodom do sadržaja ukupnih šećera od 13%, a pH fermentacionih podloga je podešen na 5 dodatkom 10% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Fermentacija je izvedena prema postupku opisanom u radu Popov i saradnika (2010), s tom razlikom da je ona prekinuta nakon 38 h, jer je u pomenutom radu ovo vreme utvrđeno kao optimalno. Nakon toga, bioetanol i druge isparljive materije su izdvojeni iz fermentacione komine destilacijom. Destilacija je prekidana kada je predestilisalo 10% zapremine fermentacione komine. Ostatak fermentacione komine, koji predstavlja tečni otpad, naziva se džibra ili otpadna voda od proizvodnje bioetanola. Dobijene otpadne vode su čuvane u frižideru na  $+4^{\circ}\text{C}$ , a eksperimenti na njima su izvođeni u naredna dva dana.



### 3.5. TESTOVI KOAGULACIJE

Za procenu koagulacione aktivnosti prirodnih koagulanata korišćeni su testovi koagulacije, izvedeni na džar testeru (VELP FC6S), uređaju koji se sastoji iz 6 šaržnih reaktora (čaha) u kojima se vrši mešanje željenom brzinom. U čaše se razlije po 200 ml model vode ili odgovarajuće otpadne vode (eksperimenti u okviru poglavlja 4.11.), i one se postave na džar tester. Pri brzini mešanja od 200 o/min, u čaše se dodaje određena zapremina koagulant. Po isteku 1 minuta nakon dodavanja koagulant, brzina mešanja se smanji na 60 o/min, i mešanje nastavi narednih pola sata. Nakon što je mešanje završeno, sadržaj čaha se pažljivo prebaci u graduisane cilindre, i ostavi da stoji sat vremena bez pomeranja kako bi se obrazovane flokule istaložile. Istovremeno se na taloženje stavi i slepa proba koja se sastoji od 200 ml početne model vode ili otpadne vode, bez koagulant. Po isteku vremena predviđenog za taloženje, iz svakog cilindra se odpipetira gornji izbistreni deo tečnosti u kojoj se izmeri mutnoća, ili/i odredi permanganatni broj ili HPK. Koagulaciona aktivnost izražena preko mutnoće se računa po formuli:

$$KA_M(\%) = \frac{M_{sp} - M_p}{M_{sp}} \cdot 100 \quad (6)$$

gde je:  $M_{sp}$  – mutnoća slepe probe [NTU], i  
 $M_p$  – mutnoća uzorka (probe) [NTU].

Koagulaciona aktivnost izražena preko permanganatnog broja se računa po formuli:

$$KA_{PB}(\%) = \frac{PB_{sp} - PB_p}{PB_{sp}} \cdot 100 \quad (7)$$

gde je:  $PB_{sp}$  – permanganatni broj slepe probe [mg KMnO<sub>4</sub>/l], i  
 $PB_p$  – permanganatni broj uzorka (probe) [mg KMnO<sub>4</sub>/l].

Koagulaciona aktivnost izražena preko HPK se računa po formuli:

$$KA_{HPK}(\%) = \frac{HPK_{sp} - HPK_p}{HPK_{sp}} \cdot 100 \quad (8)$$

gde je:  $HPK_{sp}$  – HPK vrednost slepe probe [mg O<sub>2</sub>/l], i  
 $HPK_p$  – HPK vrednost uzorka (probe) [mg O<sub>2</sub>/l].

Testovi koagulacije su izvedeni u tri ponavljanja, a prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti.

### 3.6. ANALITIČKE METODE

U okviru rada su korišćene sledeće analitičke metode:

- Sadržaj ukupnih šećera je određivan direktno sa Luff-ovim rastvorom (Pravilnik, 1983),
- Sadržaj ukupnog azota u čvrstim uzorcima je određivan metodom po Kjeldahl-u (MEBAK, 1997), a sadržaj proteina je izračunat na osnovu sadržaja azota,
- Sadržaj fitinske kiseline određivan je metodom Haug-a i Lantzscha (Haug and Lantzscha, 1983),

- Ukupni fenoli su određivani Folin-Ciocalteu kolorimetrijom (Waterhouse, 2002),
- Koncentracija proteina je određivana metodom po Bradford-u (Bradford, 1976),
- Permanganatni broj je određivan u kiseloj sredini metodom po Kübel-Tiemann-u (Voda za piće, 1990),
- Suva materija, pepeo, organska suva materija, lako taložive materije, suspendovane materije, pepeo suspendovanih materija, organska suva materija suspendovanih materija, ukupna tvrdoća, kalcijum, magnezijum, hloridi, sulfati, nitrati, fosfati, sadržaj ukupnog azota u tečnim uzorcima, BPK i HPK su određivani prema Standard methods (APHA, 1998),
- Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana je određivan metodom 32-07 (AACC, 1995),
- Mutnoća je određivana na turbidimetru (TURB 550 IR) i izražena u nefelometrijskim jedinicama mutnoće (NTU),
- Zeta potencijal je određivan na zetamtru Zetasizer Nano ZS – Red badge (ZEN3600), Malvern Instruments, prema uputstvu proizvođača,
- pH je meren na pH-metru Oakton® Ion 6,
- Elektroprovodljivost je merena na konduktometru Oakton® CON 6.

### 3.7. METODA ODZIVNE POVRŠINE

Metoda odzivne površine (NIST/SEMATECH, 2014) predstavlja zbir statističkih alata i tehnika za obradu eksperimentalnih podataka koje daju funkcionalnu vezu između niza nezavisnih eksperimentalnih promenljivih (varijable, faktori) i odziva (zavisno promenljiva), odnosno omogućavaju uvid u ponašanje celokupnog ispitivanog sistema bez ispitivanja svih mogućih kombinacija eksperimentalnih faktora. Može se koristiti u različite svrhe, ali je optimizacija (maksimizovanje ili minimizovanje odziva) najčešća. Za utvrđivanje optimalnih vrednosti tri parametra (početna mutnoća i pH vrednost model vode i doza koagulanta), a s ciljem postizanja maksimalnog odziva (koagulacione aktivnosti sirovog ekstrakta pasulja i IV frakcije dobijene ultrafiltracijom ovog ekstrakta), u okviru ovog rada je primenjen Box-Behnken-ov eksperimentalni dizajn. Dobijeni eksperimentalni podaci su fitovani polinomom drugog reda:

$$Y = b_0 + \sum b_i v_i + \sum b_{ij} v_i v_j + \sum b_{ii} v_i^2 \quad (9)$$

gde je:  $Y$  – odziv (koagulaciona aktivnost ( $KA_M$ ) [%]),

$v$  – procesni parametri (početna mutnoća model vode [NTU], pH model vode, doza koagulanta [ml/l]),

$b_0$  – odsečak,

$b_i$  – linearni koeficijenti,

$b_{ij}$  – koeficijenti interakcije, i

$b_{ii}$  – kvadratni koeficijenti.

Eksperimentalni podaci su analizirani primenom softvera Design-Expert® 7.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. UTICAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA EKSTRAKCIJU PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA

Postupci bistrenja vode koji se tradicionalno primenjuju u nekim slabije razvijenim zajednicama korišćenjem semena *M. oleifera*-e se izvode tako što se mahune sakupe, semenke se odvoje i samelju. Dobijeni prah se zatim direktno dodaje u vodu koja se obrađuje. Veliki broj istraživača u svojim radovima primenjuje samo ovu fazu obrade sirovine kako bi simulirali tradicionalni način (samo sušenje i mlevenje delova biljaka), koji se generalno primenjuje u nekim lokalnim zajednicama u odsustvu sofisticirane procesne opreme. Kao što je ranije već rečeno, ovakav način primene prirodnih koagulanata ima značajan nedostatak, s obzirom na to da dobijeni prah ne sadrži samo aktivne koagulantne materije, već i različita biljna tkiva koja su bogata organskim konstituentima, i time povećavaju sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi. Međutim, u nekim lokalnim zajednicama, dobijeni prah biljaka se stavlja u malu propustljivu vrećicu, koja se zatim zakači na štap i provlači kroz vodu. Iako ljudi koji primenjuju ovakav postupak nisu toga svesni, oni zapravo na taj način izvode ekstrakciju aktivnih komponenata iz samlevenog semena. Stoga se deo istraživača kroz svoja ispitivanja fokusirao na ekstrakciju koagulantnih materija iz biljnog materijala.

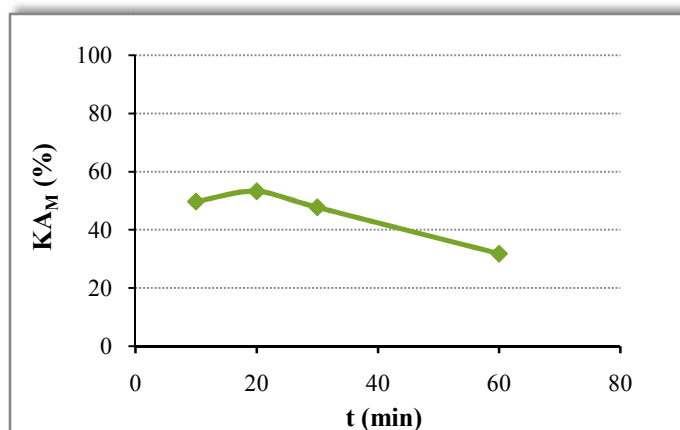
Izdvajanje biljnih proteina ekstrakcijom je postupak kojim se naučna zajednica bavi već više od 200 godina. Na početku sistematskog istraživanja biljnih proteina (početak XX veka), njihova klasifikacija je bila zasnovana na razlikama u rastvorljivosti. Poznata je Osbornova klasifikacija biljnih proteina na osnovu njihove rastvorljivosti u različitim rastvaračima u četiri grupe: albumini – rastvorljivi u vodi, globulini – rastvorljivi u rastvorima soli, prolamini – rastvorljivi u smešama alkohol/voda i glutelini – rastvorljivi u razblaženim kiselinama i bazama. Iako ima i raznih drugih klasifikacija biljnih proteina, kao što je recimo ona bazirana na njihovoj funkciji, po kojoj se oni dele u tri grupe (skladišni proteini, strukturni i metabolički proteini, i zaštitni proteini), i koja je u današnje vreme dosta zastupljena, ipak se Osbornova klasifikacija i dalje široko primenjuje, pa se različiti skladišni proteini semena biljaka razlikuju na osnovu njihove rastvorljivosti. Stoga, sadržaj i priroda proteina u rastvorima dobijenim različitim postupcima ekstrakcije variraju, posebno u slučajevima kada se kao ekstragensi koriste rastvori sa većom koncentracijom soli ili pufera u poređenju sa vodenim ekstraktima.

Cilj ovog dela istraživanja je bio da se utvrde optimalni uslovi za ekstrakciju prirodnih koagulanata iz zrna pasulja.

#### 4.1.1. Uticaj vremena trajanja ekstrakcije na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata

U eksperimentima ispitivanja uticaja vremena trajanja ekstrakcije na koagulacionu aktivnost, izvedena je ekstrakcija iz samlevenog i prosejanog zrna pasulja pri ekstrakcionom odnosu 1:100, po proceduri opisanoj u poglavlju 3.1., sa destilovanom vodom kao ekstragensom, na sobnoj temperaturi, u trajanju od 10, 20, 30 i 60 minuta. Nakon ekstrakcije, sa dobijenim ekstraktima su izvedeni testovi koagulacije (po proceduri opisanoj u poglavlju 3.5.) u model vodi čija je početna mutnoća iznosila 35 NTU i pH vrednost 9, što je odabrano na osnovu literaturnih podataka (Okuda et al., 2001a). Ekstrakti su primenjeni u dozi od

3 ml/l. Dobijene koagulacione aktivnosti ekstrakata u zavisnosti od vremena trajanja ekstrakcije su prikazane na Slici 13.

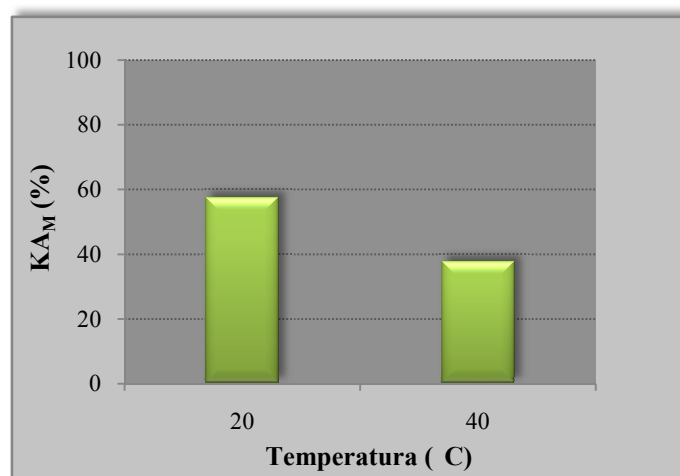


Slika 13. Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih iz zrna pasulja od vremena trajanja ekstrakcije

Sa grafika se može videti da sa porastom vremena ekstrakcije do 20-og minuta, koagulaciona aktivnost dobijenih ekstrakata blago raste. Sa daljim produžavanjem trajanja ekstrakcije, koagulaciona aktivnost dobijenih ekstrakata opada. Dakle, maksimalnu koagulacionu aktivnost od 53,3% ima ekstrakt čije je vreme ekstrakcije iznosilo 20 minuta. S obzirom na to da se za duplo kraće vreme ekstrakcije (10 minuta) dobija ekstrakt čija je koagulaciona aktivnost nešto niža (49,7%), za dalji rad je odabrano vreme trajanja ekstrakcije od 10 minuta.

#### 4.1.2. Uticaj temperature pri ekstrakciji na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata

S obzirom na to da temperatura može imati značajan uticaj na rastvorljivost aktivnih materija, u narednom eksperimentu je ispitan uticaj temperature pri ekstrakciji na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata. Ekstrakcija je izvedena kao i u prethodnom eksperimentu, sa destilovanom vodom, u trajanju od 10 minuta, na 20°C i na 40°C. Sa dobijenim ekstraktima su izvedeni testovi koagulacije u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9. Doza ekstrakata je iznosila 3 ml/l. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 14.



Slika 14. Uticaj temperature pri ekstrakciji na koagulacionu aktivnost ekstrakata dobijenih iz zrna pasulja

Sa Slike 14 se vidi da ekstrakt dobijen ekstrakcijom na 20°C ima veću koagulacionu aktivnost u poređenju sa ekstraktom dobijenim na 40°C. Na osnovu ovakvih rezultata, ekstrakcije u narednim eksperimentima su izvođene na sobnoj temperaturi.

#### 4.1.3. Uticaj vrste primenjenog ekstragensa na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata

Kao što je u teorijskom delu već objašnjeno, primenjeni ekstragens će imati značajan uticaj na vrstu i količinu proteina koji će biti izdvojeni tokom ekstrakcije. S obzirom na to da pasulj sadrži veliki procenat proteina, i da se očekuje da su uglavnom oni nosioci koagulacione aktivnosti, pretpostavka je da će primenjeni ekstragens uticati i na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata.

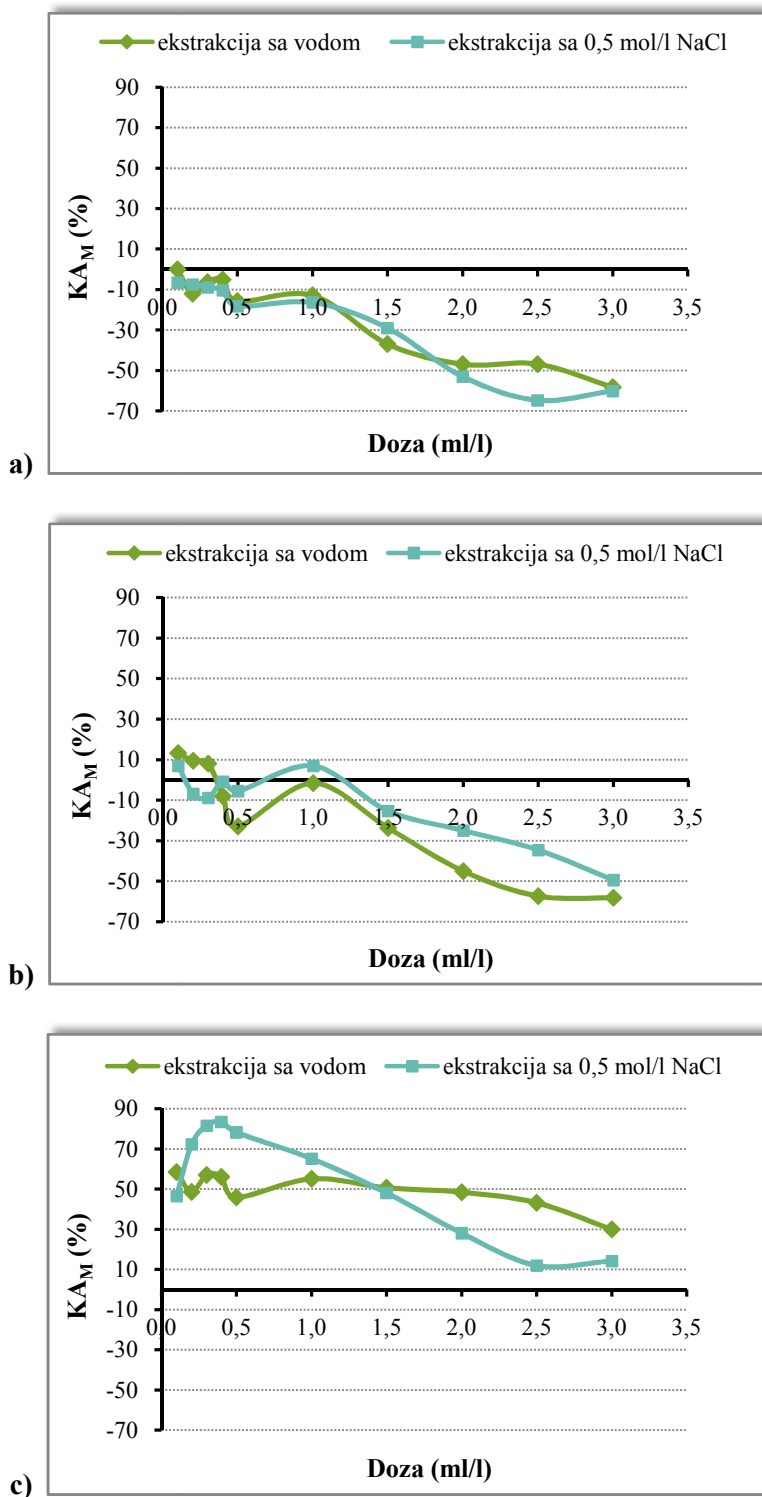
U prvim ispitivanjima prirodnih koagulanata, ekstrakcija je uglavnom izvođena česmenskom vodom, destilovanom vodom ili fosfatnim puferom. Kasnije su Okuda i saradnici (1999) ukazali na to da se ekstrakcija aktivnih koagulacionih komponenti može poboljšati primenom rastvarača veće jonske jačine. Pregled različitih ekstragenasa primenjenih za ekstrakciju koagulantnih materija iz biljnog materijala koji se mogu naći u literaturi je dat u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Pregled različitih ekstragenasa koagulantnih materija iz biljnog materijala objavljenih u literaturi

Rastvarač:	Reference:
<b>voda (nije detaljnije specificirano)</b>	Olsen, 1987
<b>česmenska voda</b>	Jahn, 1988; Ndabigengesere and Narasiah, 1998a; Muyibi et al., 2002; Bhuptawat et al., 2007
<b>destilovana voda</b>	Okuda et al., 1999; Bhatia et al., 2007a, 2007b; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2009a; Pritchard et al., 2009; Katayon et al., 2006; Ghebremichael et al., 2006; Ghebremichael et al., 2005; Šćiban et al., 2009; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2008
<b>voda, petroletar, aceton, hloroform i heksan</b>	Ndabigengesere et al., 1995
<b>etanol</b>	Jeon et al., 2009
<b>rastvor NaCl, KNO<sub>3</sub>, KCl, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl</b>	Okuda et al., 1999, 2001a, 2001b; Prasad, 2009; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2009a; Ghebremichael et al., 2005; Beltrán-Heredia et al., 2009a, 2009b; Šćiban et al., 2009; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2008
<b>amonijum-acetatni pufer</b>	Sánchez-Martín et al., 2010; Ghebremichael et al., 2006

Iz pregleda literature se vidi da je najveći broj istraživača izvodio ekstrakciju ili sa destilovanom vodom, što je svakako najbolja opcija zbog njenog obilja i cene, ili sa rastvorima različitih soli. S obzirom na to da se ovim rastvaračima ekstrahuju različite vrste proteina, koje mogu imati i različitu koagulacionu aktivnost, u nastavku eksperimenata je izvedena ekstrakcija destilovanom vodom i rastvorom soli, nakon čega je upoređena koagulaciona aktivnost dobijenih ekstrakata u model vodama različite početne mutnoće i različite pH vrednosti. S obzirom na to da su Okuda i saradnici (1999), ispitujući uticaj vrste soli (NaCl, KNO<sub>3</sub>, KCl i NaNO<sub>3</sub>) na koagulacionu aktivnost ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa njihovim rastvorima utvrdili da nema značajnijih razlika u koagulacionoj aktivnosti između njih, za ekstrakciju rastvorom soli je ovde izabran NaCl, kao najjeftinija od pomenutih soli. Uticaj vrste primenjenog ekstragensa na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata pri različitim dozama, u model vodama čija je pH vrednost 6, a početne mutnoće 50, 100 i 200 NTU je prikazan na Slici 15.

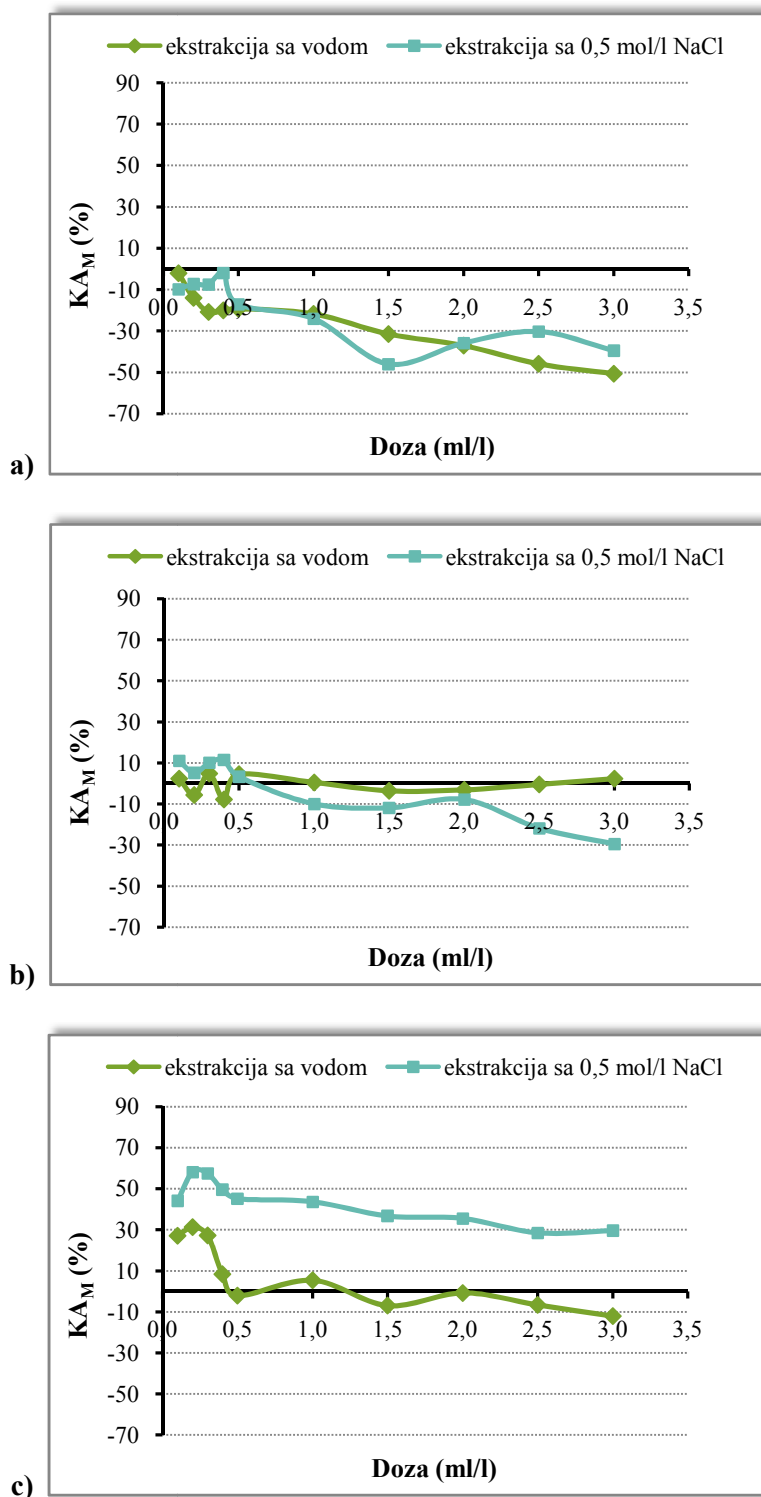
Sa Slike 15 se može videti da se na pH vrednosti 6 i pri nižim početnim mutnoćama model vode (50 NTU i 100 NTU) ekstrakti ponašaju veoma slično, i imaju zanemarljivu koagulacionu aktivnost. Za većinu primenjenih doza kod ove dve model vode, koagulaciona aktivnost je čak i negativna, što se može objasniti time da najveći broj molekula aktivne materije iz dodatih ekstrakata zbog male koncentracije suspendovanih čestica ne uspevaju da obrazuju flokule i da se istalože, već zaostaju u izbistrenoj vodi doprinoseći povećanju njene mutnoće. Ova teza se može potkrepiti i činjenicom da, što se više povećava doza dodatih ekstrakata, koagulaciona aktivnost je sve više negativna (veća količina koagulanta preostaje u „izbistrenoj“ vodi, povećavajući njenu mutnoću). Na početnoj mutnoći model vode 200 NTU, ponašanje vodenog i NaCl-ekstrakta je različito. Vodeni ekstrakt pokazuje relativno ujednačenu koagulacionu aktivnost pri svim primenjenim dozama, sa maksimalnom koagulacionom aktivnošću od 58,4% pri dozi 0,1 ml/l. NaCl-ekstrakt ima značajno veću koagulacionu aktivnost od vodenog ekstrakta pri nižim dozama, dok pri višim dozama njegova aktivnost mnogo brže opada u poređenju sa vodenim ekstraktom. Maksimalnu koagulacionu aktivnost, 83,5%, ovaj ekstrakt postiže pri dozi 0,4 ml/l.



**Slika 15.** Koagulacione aktivnosti vodenog i NaCl-ekstrakta zrna pasulja u model vodi pH vrednosti 6, početnih mutnoća: a) 50 NTU, b) 100 NTU i c) 200 NTU

Na Slici 16 prikazana je zavisnost koagulacione aktivnosti vodenog i NaCl-ekstrakta od primenjene doze, u model vodama pH vrednosti 8 i početnih mutnoća 50, 100 i 200 NTU. Kao i u prethodnom slučaju, i ovde ekstrakti pokazuju slično ponašanje u model vodama početnih mutnoća 50 NTU i 100 NTU, i imaju negativnu koagulacionu aktivnost pri skoro svim primenjenim dozama. U model vodi početne mutnoće 200 NTU, njihova aktivnost se

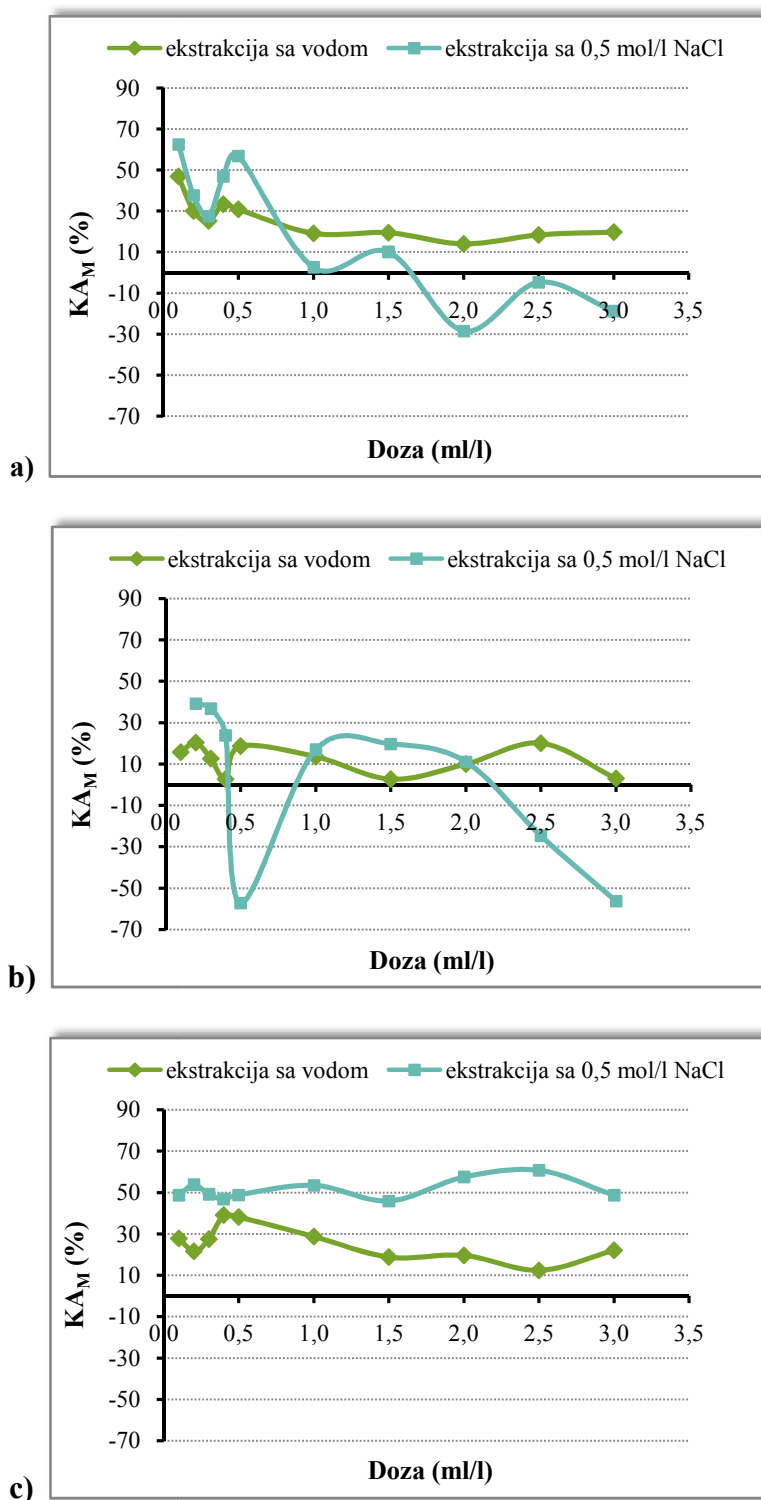
povećava. I jedan i drugi ekstrakt postižu maksimalnu aktivnost pri dozi 0,2 ml/l, i to 31,3% vodeni ekstrakt i 58,1% NaCl-ekstrakt.



**Slika 16.** Koagulacione aktivnosti vodenog i NaCl-ekstrakta zrna pasulja u model vodi pH vrednosti 8, početnih mutnoća: a) 50 NTU, b) 100 NTU i c) 200 NTU

Zavisnost koagulacione aktivnosti vodenog i NaCl ekstrakta od primenjene doze u model vodama početnih mutnoća 50, 100 i 200 NTU, na pH 10 je prikazana na Slici 17.





**Slika 17.** Koagulacione aktivnosti vodenog i NaCl-ekstrakta zrna pasulja u model vodi pH vrednosti 10, početnih mutnoća: a) 50 NTU, b) 100 NTU i c) 200 NTU

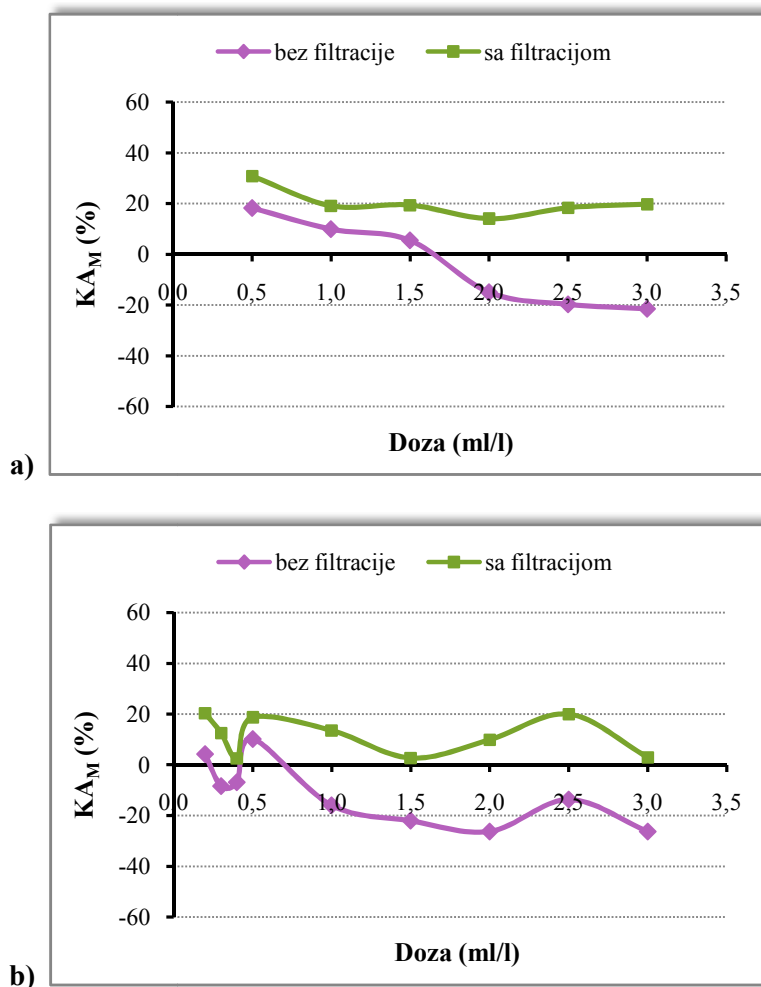
Za razliku od trenda da ekstrakti imaju slično ponašanje u model vodama čije su pH vrednosti 8 (osim u model vodi početne mutnoće 200 NTU) i posebno 6, u slučaju model vode čija je pH vrednost 10, vodeni i NaCl-ekstrakt se ponašaju znatno drugačije. Ovo se može objasniti upravo činjenicom da se sa vodom i rastvorom NaCl kao ekstragensima ekstrahuju potpuno različiti proteini, čije su izoelektrične tačke različite, pa će se oni različito ponašati na istoj pH vrednosti.

Pored razlika koje ekstrakti pokazuju prilikom koagulacije, potrebno je naglasiti da je postojala i primetna razlika u njihovom izgledu: vodeni ekstrakt je imao izgled mlečno bele suspenzije, kod koje stajanjem relativno brzo dolazi do izdvajanja belog taloga, dok je NaCl-ekstrakt bio žućkasto-bele boje, lepljiv i talog se izdvajao znatno sporije.

S obzirom na to da su i vodeni i NaCl-ekstrakt, u zavisnosti od uslova sredine, pokazali dobru koagulacionu aktivnost, u daljim ispitivanjima je rađeno i sa jednim i sa drugim ekstraktom.

#### 4.1.4. Uticaj primene filtracije na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata

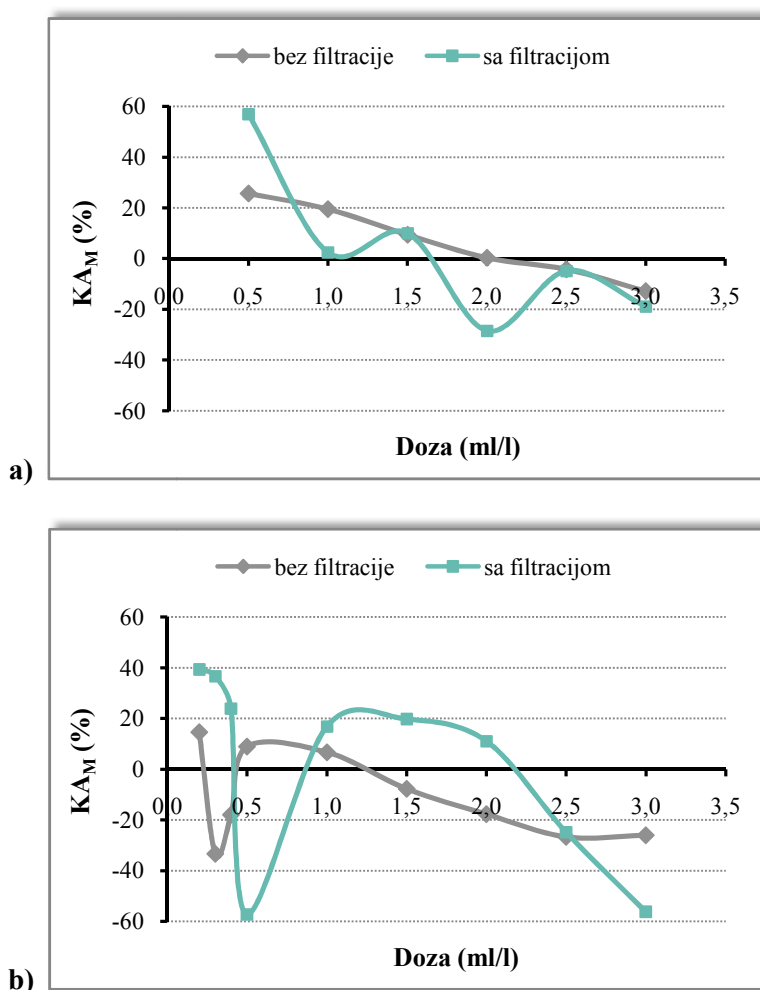
S obzirom na to da ekstrakti pre filtracije sadrže značajnu količinu suspendovanih čestica, tokom rada se javila ideja da bi ove suspendovane čestice mogle da posluže tokom bistrenja ugrađujući se u flokule i povećavajući na taj način njihovu težinu, odnosno da bi mogle uticati da bistrenje vode bude bolje. Pored toga, izbacivanje koraka filtracije kod pripreme sirovog ekstrakta bi pojednostavilo i pojeftinilo postupak dobijanja prirodnog koagulanta. Stoga je u narednim eksperimentima proverena ova hipoteza – ispitana je efikasnost koagulacije sa nefiltriranim i filtriranim vodenim (Slika 18) i NaCl-ekstraktom (Slika 19) zrna pasulja u model vodi pH vrednosti 10, na dve početne mutnoće, 50 i 100 NTU.



**Slika 18.** Zavisnost koagulacione aktivnosti nefiltriranog i filtriranog vodenog ekstrakta zrna pasulja u model vodi pH vrednosti 10, čija je početna mutnoća:  
a) 50 NTU i b) 100 NTU

Sa Slike 18 se vidi da i u jednoj i u drugoj model vodi pri svim primenjenim dozama profiltrirani ekstrakt postiže bolju koagulacionu aktivnost, dok nefiltrirani ekstrakt, pored slabije efikasnosti bistrenja, pri nekim dozama čak i povećava rezidualnu mutnoću tretirane model vode. Ovakvo ponašanje navodi na zaključak da se sa nefiltriranim ekstraktom u vodu koja se obrađuje unose fine suspendovane čestice koje se teško talože i nakon koagulacije preostaju u obrađenoj vodi povećavajući njenu mutnoću. Takođe, s obzirom na isti trend krivih, može se zaključiti da prisutne suspendovane čestice ne učestvuju u obrazovanju flokula, već se krupnije od njih brzo istalože (što je bilo vidljivo golim okom tokom izvođenja eksperimenta), a one fino suspendovane, kao što je već rečeno, preostaju da lebde u obrađenoj vodi, smanjujući prividno efikasnost samih koagulacionih materija prisutnih u ekstraktu.

Na Slici 19 je prikazana koagulaciona aktivnost u funkciji primenjene doze za nefiltriran i profiltriran NaCl-ekstrakt u model vodama čija je pH vrednost 10, a početne mutnoće 50 i 100 NTU.



**Slika 19.** Zavisnost koagulacione aktivnosti nefiltriranog i filtriranog NaCl-ekstrakta zrna pasulja u model vodi pH vrednosti 10, čija je početna mutnoća:  
a) 50 NTU i b) 100 NTU

U ovom slučaju ponašanje ekstrakata je kompleksnije, odnosno pri nekim dozama nefiltrirani ekstrakt ima bolju aktivnost od filtriranog. Ipak, u slučaju obe model vode, maksimalnu koagulacionu aktivnost je pokazao profiltrirani NaCl-ekstrakt, i to 56,9% u model vodi početne mutnoće 50 NTU i 39,2% u model vodi početne mutnoće 100 NTU.

S obzirom na to da se kroz prethodne eksperimente pokazalo da je filtracija ekstrakta neophodna tokom njegove pripreme, u daljem radu je ona primenjivana kao standardni korak prilikom dobijanja sirovih ekstrakata.

## 4.2. SASTAV EKSTRAKTA ZRNA PASULJA

S obzirom na to da pasulj sadrži različite materije koje mogu imati koagulacionu aktivnost, a koje se mogu ekstrahovati u manjoj ili većoj meri, u zavisnosti od primenjenog rastvarača, kao i od vremena trajanja ekstrakcije, u sledećim ispitivanjima je analiziran sastav ekstrakata pasulja dobijenih na različite načine – za različito vreme ekstrakcije i primenom različitih ekstragenasa. Pored toga, analiziran je i sastav ekstrakata dobijenih iz celog zrna pasulja, jezgra pasulja i pokožice, kako bi se videlo kakva je distribucija različitih materija u različitim delovima semena, pa time i u ekstraktima. U ispitivanim ekstraktima je određen sadržaj ukupnih šećera, azota, fitinske kiseline i ukupnih fenola, a sadržaj proteina je izračunat na osnovu sadržaja azota, s obzirom na to da se može uzeti da se sav prisutan azot u pasulju nalazi u sastavu proteina. Sve analize su rađene u tri ponavljanja, i izračunata je srednja vrednost ( $X_{sr}$ ), standardna devijacija ( $\sigma$ ) i koeficijent varijacije, a rezultati su prikazani kao  $X_{sr} \pm 3\sigma$ .

Pre same ekstrakcije i analize dobijenih ekstrakata, u samlevenom celovitom zrnu, pokožici i jezgru pasulja su određeni suva materija i ukupni azot, a dobijeni rezultati analize su dati u Tabeli 5. Pokožica je odvojena od jezgra pasulja tako što su zrna izložena dejstvu vodene pare, a zatim je pokožica oguljena. Nakon ljuštenja su pokožica i jezgro osušeni.

**Tabela 5.** Sadržaj suve materije, ukupnog azota i proteina (računato preko sadržaja azota) u čvrstim uzorcima celog zrna, pokožice i jezgra pasulja

Parametar:	Celo zrno pasulja:	Jezgro pasulja:	Pokožica pasulja:
Suva materija (%)	87,23	85,49	88,29
Ukupni azot (% sm)	3,25	3,70	1,03
Sadržaj proteina (% sm)	20,28	23,09	6,44

Kako se iz Tabele 5 vidi, sadržaj suve materije je približno jednak u svim uzorcima. Što se tiče sadržaja azota u pasulju, on je oko 4 puta veći od sadržaja azota u čvrstom uzorku žira lužnjaka i divljeg kestena, koji su ispitivani kao mogući izvori koagulanata tokom skrining eksperimenata za određivanje izvora prirodnih koagulanata sa kojim će se dalje raditi (Šćiban et al., 2009). S obzirom da azot potiče uglavnom od proteina u pasulju, to njegov sadržaj govori i o sadržaju proteina. Što se tiče podataka dobijenih za druge leguminoze (Šćiban et al., 2005), jedino seme bagrema ima 2 puta veći sadržaj azota, dok semena rogača i bagremca imaju približne vrednosti kao pasulj. Takođe, seme soje ima za oko 50% veći sadržaj azota od pasulja (Šćiban i sar., 2009). Sadržaj azota u jezgru pasulja i celom zrnu je sličan, dok je u pokožici on niži za više od 70% u odnosu na jezgro.

### 4.2.1. Ekstrakti celog zrna pasulja dobijeni ekstrakcijom sa destilovanom vodom u trajanju od 10 minuta i 3 sata

Kako bi se ispitalo da li duže vreme ekstrakcije doprinosi povećanju sadržaja ekstrahovanih materija, ekstrakcija je izvedena sa destilovanom vodom u trajanju od 10

minuta i 3 sata, pri ekstrakcionom odnosu 1:100. Dobijeni ekstrakti su analizirani, a uporedni rezultati su dati u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Sadržaj različitih materija u ekstraktima celog zrna pasulja dobijenim ekstrakcijom sa destilovanom vodom u trajanju od 10 minuta i 3 sata

		Ukupni šećeri (mg/l)	Azot po Kjeldahl-u (mg/l)	Proteini (mg/l)	Fitinska kiselina (mg/l)	Ukupni fenoli (mg/l)
10 min	Uzorak 1	725,20±102,85	311,50	1946,88	13,76±3,43	1,07±0,02
	Uzorak 2	668,00±198,91	299,25	1870,31	15,19±3,34	1,15±0,04
	Uzorak 3	760,00±182,68	280,00	1750,00	11,04±0,55	1,08±0,02
	Srednja vrednost	717,73	296,92	1855,75	13,33	1,10
3 h	Uzorak 1	811,32±42,56	301,00	1881,25	13,69±6,07	1,16±0,06
	Uzorak 2	699,34±135,28	311,50	1946,88	10,39±2,24	1,23±0,07
	Srednja vrednost	755,33	306,25	1914,06	12,17	1,19
Povećanje sadržaja (%)		+5,24	+3,14	+3,14	-8,70	+8,18

Iz tabele se može primetiti da je sadržaj ugljenih hidrata, i posebno proteina, visok u ispitivanim ekstraktima pasulja, dok je sadržaj fenolnih komponenti dosta nizak. Određivanje fenolnih komponenti je mnogo preciznije od određivanja ukupnih šećera i fitinske kiseline, što se vidi na osnovu koeficijenta varijacije za ponovljena merenja, koji se za ukupne fenole kreće od 0,6 – 1,2%, dok je za ukupne šećere 5 – 10%, a za fitinsku kiselinu 1,5 – 8%. Takođe, upoređivanjem rezultata analize za tri uzorka se vidi da se može očekivati dobra ponovljivost ekstrakcije za sadržaj fenolnih komponenti, proteina i ukupnih šećera u ekstraktu, dok sadržaj fitinske kiseline u nekim slučajevima značajnije varira u pojedinačnim uzorcima.

Iz podataka prikazanih u tabeli se takođe vidi da produžetak trajanja ekstrakcije ne utiče značajnije na sastav dobijenog ekstrakta. Sadržaj ukupnih šećera se povećava sa produženjem trajanja ekstrakcije za 5,24%, proteina za 3,14% i fenolnih materija za 8,18%, dok se sadržaj ekstrahovane fitinske kiseline pri dužem vremenu ekstrakcije smanjuje za 8,7%. Na osnovu ovoga, kao i rezultata vezanih za koagulacionu aktivnost, prikazanih u poglavlju 4.1.1., može se zaključiti da je za ekstrakciju dovoljno vreme od 10 minuta.

#### 4.2.2. Ekstrakti celog zrna pasulja dobijeni ekstrakcijom sa destilovanom vodom, 0,5 M NaCl i 1 M NaCl u trajanju od 10 minuta

U sledećem koraku je ispitan uticaj vrste i jonske jačine ekstragensa na sadržaj ekstrahovanih materija. Ekstrakcija je izvedena iz celog zrna pasulja, sa destilovanom vodom, 0,5 mol/l rastvorom NaCl i 1 mol/l rastvorom NaCl, u trajanju od 10 minuta pri ekstrakcionom odnosu 1:100. Dobijeni ekstrakti su analizirani na sadržaj različitih materija, a rezultati analize su prikazani u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Sadržaj različitih materija u ekstraktima celog zrna pasulja dobijenim ekstrakcijom sa destilovanom vodom, 0,5 mol/l i 1 mol/l rastvorima NaCl u trajanju od 10 minuta

			Ukupni šećeri (mg/l)	Azot po Kjeldahl-u (mg/l)	Proteini (mg/l)	Fitinska kiselina (mg/l)	Ukupni fenoli (mg/l)
Ekstragens	Destilovana voda	Uzorak 1	725,20±102,85	311,50	1946,88	13,76±3,43	1,07±0,02
		Uzorak 2	668,00±198,91	299,25	1870,31	15,19±3,34	1,15±0,04
		Uzorak 3	760,00±182,68	280,00	1750,00	11,04±0,55	1,08±0,02
		Srednja vrednost	717,73	296,92	1855,75	13,33	1,10
	0,5 mol/l NaCl	Uzorak 1	602,74±96,08	276,50	1728,12	16,61±0,62	1,05±0,03
		Uzorak 2	505,60±66,51	318,50	1990,62	13,82±0,54	1,27±0,06
		Srednja vrednost	554,17	297,50	1859,37	15,21	1,16
	1 mol/l NaCl	Uzorak 1	384,00±99,76	322,00	2012,25	10,95±0,44	1,17±0,03
		Uzorak 2	428,80±33,25	329,00	2056,25	12,53±4,46	1,24±0,08
		Srednja vrednost	406,40	325,50	2034,37	11,74	1,20

Iz rezultata analize se vidi da ekstrakti dobijeni ekstrakcijom sa rastvorima NaCl sadrže nešto veću količinu proteina i fenolnih materija od ekstrakata kod kojih je destilovana voda bila ekstragens. Sadržaj ukupnih šećera je najveći u vodenom ekstraktu, a najmanji u ekstraktu dobijenom sa 1 mol/l NaCl. Ovakvi rezultati ukazuju na to da prisustvo soli može imati uticaja na ekstrakciju pojedinih komponenti iz pasulja, što se kasnije može odraziti i na koagulacionu aktivnost.

#### 4.2.3. Ekstrakti celog zrna pasulja, jezgra i pokožice dobijeni ekstrakcijom sa 0,5 M NaCl u trajanju od 10 minuta

Na kraju ove grupe eksperimenata ispitan je sastav ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl u trajanju od 10 minuta iz celog zrna pasulja, iz jezgra, i iz pokožice pasulja, pri ekstrakcionom odnosu 1:100. Utvrđeni sastav ekstrakata je prikazan u Tabeli 8. Zbog male količine pokožice, iz nje je pripremljen samo jedan ekstrakt.

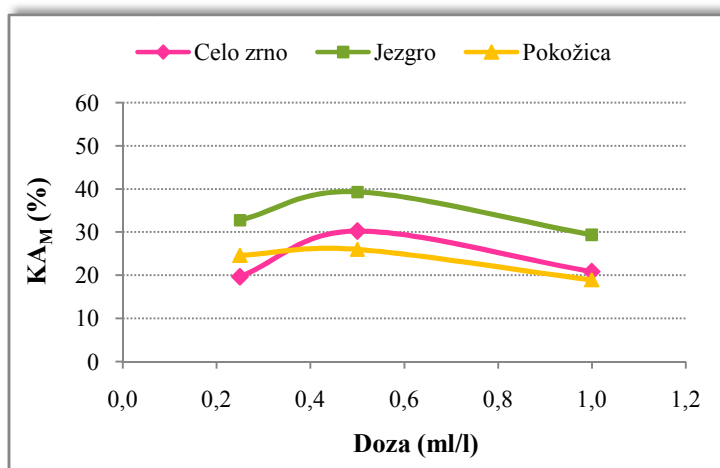
Sadržaj ukupnih šećera u ekstraktu iz pokožice je bio veoma mali, ispod granice detekcije metode kojom su šećeri određivani, pa se nije mogao odrediti. Sadržaj ukupnih šećera, proteina i fenolnih materija je najveći u ekstraktu iz celog zrna pasulja, a najniži u ekstraktu iz pokožice. Prema očekivanju, sadržaj fitinske kiseline je najveći u ekstraktu pokožice.

**Tabela 8.** Sadržaj različitih materija u ekstraktima celog zrna pasulja, jezgra i pokožice pasulja dobijenim ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl u trajanju od 10 minuta

		Ukupni šećeri (mg/l)	Azot po Kjeldahl-u (mg/l)	Proteini (mg/l)	Fitinska kiselina (mg/l)	Ukupni fenoli (mg/l)
Celo zrno	Uzorak 1	602,74±96,08	276,50	1728,12	16,61±0,62	1,05±0,03
	Uzorak 2	505,60±66,51	318,50	1990,62	13,82±0,54	1,27±0,06
	Srednja vrednost	554,17	297,50	1859,37	15,21	1,16
Jezgro	Uzorak 1	499,20±99,77	248,50	1553,12	12,72±1,45	0,64±0,02
	Uzorak 2	480,00±57,60	273,00	1706,25	10,58±0,39	0,69±0,01
	Srednja vrednost	489,60	260,75	1629,69	11,65	0,66
Pokožica	Uzorak 1	/	112,00	700,00	48,11±2,76	0,26±0,01

#### 4.3. KOAGULACIONA SVOJSTVA EKSTRAKATA OPNE, JEZGRA I CELOG ZRNA PASULJA

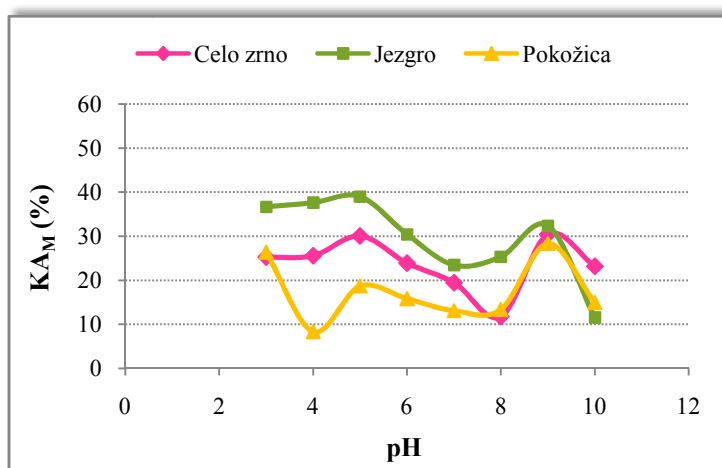
Cilj ovog dela rada je bio da se ispita da li postoje razlike u koagulacionoj sposobnosti ekstrakta dobijenog iz celog zrna pasulja i ekstrakata dobijenih samo iz pokožice i samo iz jezgra. Iz čvrstih uzoraka celog zrna pasulja i različitih delova pasulja su ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl u odnosu 1:100 dobijeni sirovi ekstrakti, koji su primenjeni kao koagulant u testovima koagulacije u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9. Zavisnost njihove koagulacione aktivnosti od primenjene doze je prikazana na Slici 20.



**Slika 20.** Koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih iz celog zrna, jezgra i pokožice pasulja u zavisnosti od primenjene doze na pH 9

Sa grafika se vidi da svi ekstrakti maksimalnu koagulacionu aktivnost postižu pri dozi od 0,5 ml/l, pri čemu je najefikasniji ekstrakt jezgra pasulja.

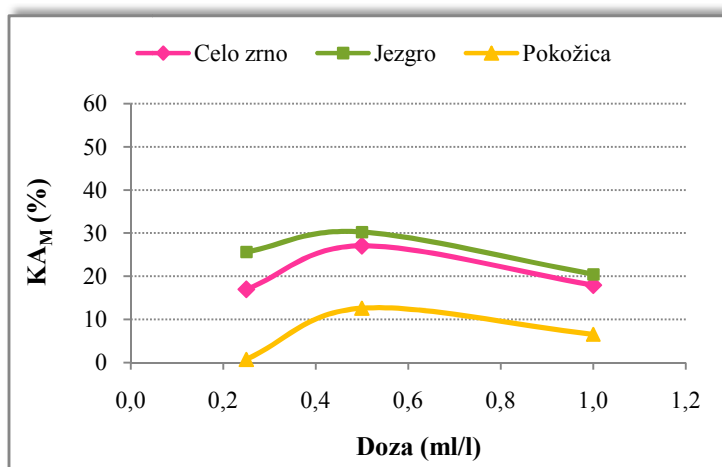
U sledećim testovima koagulacije je ispitan uticaj pH vrednosti na koagulacionu aktivnost ekstrakata u model vodi početne mutnoće 35 NTU, pri dozi od 0,5 ml/l. Rezultati su prikazani na Slici 21.



**Slika 21.** Koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih iz celog zrna, jezgra i pokožice pasulja u zavisnosti od pH vrednosti, a pri dozi od 0,5 ml/l

Sa Slike 21 je uočljivo slično ponašanje ekstrakata celog zrna i jezgra sa promenom pH vrednosti model vode, što je i bilo očekivano s obzirom na to da jezgro čini oko 92% zrna ove sorte pasulja. Ekstrakt pokožice se ponaša nešto malo drugačije od prethodna dva u oblasti nižih pH vrednosti. Najbolju koagulacionu aktivnost pokazuje ekstrakt jezgra na pH vrednostima od 3 do 5, a sva tri ekstrakta pokazuju dobru i približno jednaku koagulacionu aktivnost na pH 9. Slabiju koagulacionu aktivnost ekstrakti pokazuju u neutralnoj oblasti (pH 7 i 8), a ekstrakt pokožice i oko pH 4. Zanimljivo je da se kod ekstrakta celog zrna i jezgra javljaju praktično po dva maksimuma bliskih vrednosti, na pH 5 i pH 9.

S obzirom na to da su ekstrakti pokazali dobru koagulacionu aktivnost i na pH 5, za ovu pH vrednost je u sledećem ogledu ispitana zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakata od primenjene doze. Rezultati su prikazani na Slici 22.



**Slika 22.** Koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih iz celog zrna, jezgra i pokožice pasulja u zavisnosti od primenjene doze na pH 5

I na pH 5 vrednosti model vode svi ekstrakti maksimalnu koagulacionu aktivnost postižu pri dozi 0,5 ml/l. Najbolju efikasnost bistrenja ponovo ima ekstrakt jezgra, ali i ekstrakt celog zrna ne zaostaje previše za njim, dok ekstrakt pokožice ima veoma nisku koagulacionu aktivnost.

Da bi se ustanovilo koliki je doprinos koagulaciji samih proteina, oni su izdvojeni iz dobijenih sirovih ekstrakata celog zrna, jezgra i pokožice pasulja taloženjem sa amonijum-

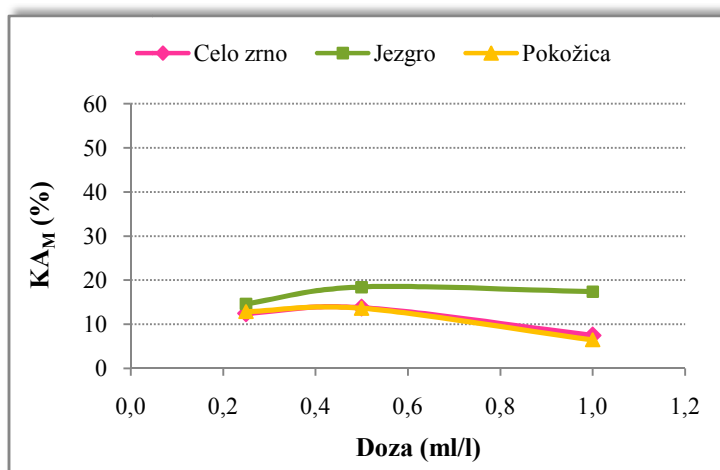


sulfatom (prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1.), talog je odvojen centrifugiranjem i resuspendovan u 0,1 mol/l fosfatnom puferu (pH 7), a prisutni amonijum-sulfat je uklonjen dijalizom, nakon čega su dobijeni odgovarajući dijalizati. U dijalizatima je određen sadržaj proteina (Tabela 9).

**Tabela 9.** Koncentracija proteina u dijalizatima celog zrna, pokožice i jezgra pasulja

Ekstrakcija iz:	Koncentracija proteina (mg/ml)
<b>Celo zrno</b>	0,3805
<b>Jezgro</b>	0,1393
<b>Pokožica</b>	0,0214

Testovima koagulacije u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9 je određena koagulaciona aktivnost dijalizata pri različitim dozama. Rezultati ovog određivanja su prikazani na Slici 23.



**Slika 23.** Koagulacione aktivnosti dijalizata dobijenih iz ekstrakata celog zrna, jezgra i pokožice pasulja u zavisnosti od primenjene doze na pH 9

Sa Slike 23 se vidi da dijalizat jezgra ima nešto bolju koagulacionu aktivnost od dijalizata celog zrna i pokožice, što je bio slučaj i sa sirovim ekstraktom jezgra na pH 9. Ipak sva tri dijalizata generalno imaju malu efikasnost bistrenja model vode, upola nižu od svojih sirovih ekstrakata iz kojih su izdvojeni.

Uklanjanjem pokožice iz pasulja se postiže poboljšanje koagulacione aktivnosti, ali s obzirom na to da to poboljšanje nije veliko, a sam postupak njenog uklanjanja je komplikovan, ekstrakcija je u daljem radu izvođena iz celog zrna pasulja.

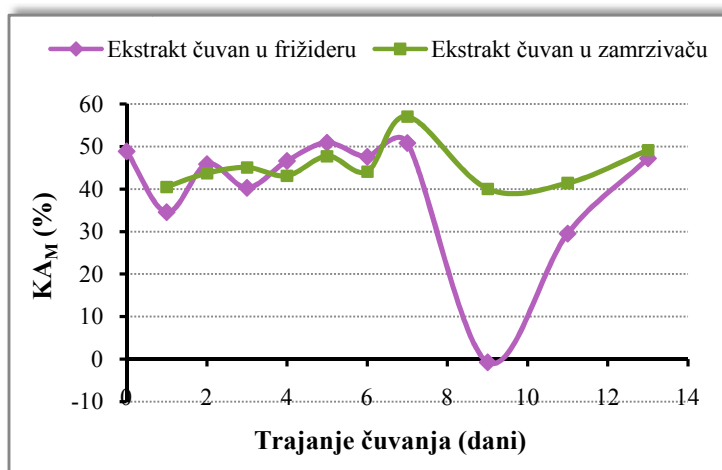
#### 4.4. TRAJNOST I ČUVANJE SIROVOG EKSTRAKTA PASULJA

Kada se uporede rezultati ispitivanja mogućnosti čuvanja semena iz koga će se kasnije ekstrahovati prirodni koagulant (Katayon et al., 2006 i Pritchard et al., 2010b), može se doći do zaključka da se seme kao osušeno i celo svakako može čuvati izvestan duži period vremena (pri čemu na koagulacione performanse kasnije dobijenog ekstrakta ne utiču temperatura čuvanja i zatvorenost/otvorenost posuda u kojima je seme čuvano), ali ukoliko se

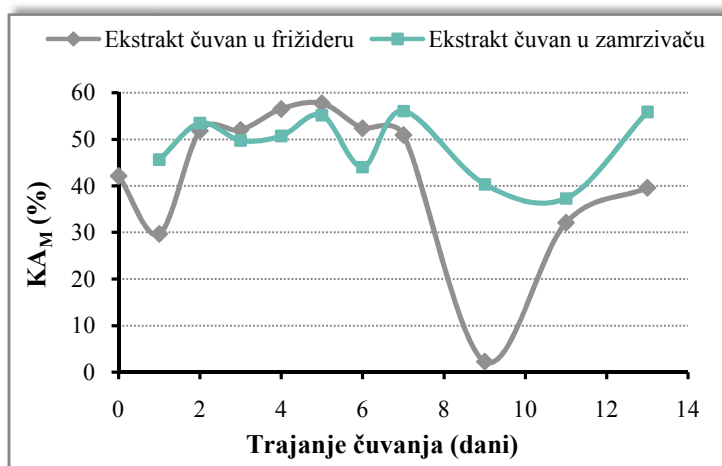
seme čuva kao samleveno, performanse ekstrakta dobijenog iz takvog semena se smanjuju mnogo brže sa vremenom čuvanja semena. Moguće objašnjenje za ovakve rezultate je to da je samleveno seme znatno izloženije i osjetljivije na oksidacione procese u poređenju sa celim semenom. U tom smislu, preporuka bi bila da se seme iz koga će se ekstrahovati prirodni koagulanti skladišti celo.

Sirovi ekstrakti dobijeni iz biljnog materijala, pa tako i sirovi ekstrakt pasulja, sadrže veliku količinu organskih materija, pa su time veoma podložni kvarenju, odnosno razgradnji od strane prisutnih mikroorganizama, što može uticati na njihovu koagulacionu aktivnost. Stoga je potrebno ispitati koliko dugo, i pri kojim uslovima čuvanja, sirovi ekstrakti zadržavaju svoju efikasnost.

U ovom radu, ispitana je mogućnost čuvanja sirovih ekstrakata pasulja dobijenih ekstrakcijom sa destilovanom vodom i sa 0,5 mol/l NaCl-om (ekstrakcioni odnos je iznosio 1:20), u frižideru (na +4°C) i u zamrzivaču. Tokom vremena čuvanja proveravana je njihova koagulaciona aktivnost u model vodi početne mutnoće 120 NTU i pH vrednosti 9, a u testovima koagulacije je primenjena doza od 0,5 ml/l. Dobijeni rezultati su prikazani na Slikama 24 i 25.



**Slika 24.** Zavisnost koagulacione aktivnosti vodenog ekstrakta pasulja čuvanog u frižideru i u zamrzivaču od vremena čuvanja (model voda, pH 9, početna mutnoća 120 NTU, doza ekstrakta 0,5 ml/l)



**Slika 25.** Zavisnost koagulacione aktivnosti NaCl-ekstrakta pasulja čuvanog u frižideru i u zamrzivaču od vremena čuvanja (model voda, pH 9, početna mutnoća 120 NTU, doza ekstrakta 0,5 ml/l)

Ono što se prvo uočava sa ova dva grafika je skoro identično ponašanje vodenog i NaCl-ekstrakta čuvanih u frižideru, kao i vodenog i NaCl-ekstrakta čuvanih u zamrzivaču. Za vodeni ekstrakt (Slika 24), ne postoji značajnija razlika između koagulacionih aktivnosti ekstrakta čuvanog u frižideru i ekstrakta čuvanog u zamrzivaču od 1-og do 7-og dana, a za NaCl-ekstrakt (Slika 25) od 2-og do 7-og dana. Male promene koagulacione aktivnosti i jednog i drugog vodenog ekstrakta u ovom periodu vremena se mogu objasniti variranjem parametara vodovodske vode, s obzirom da je od nje pripremana model voda. Isto objašnjenje se može primeniti i za oba NaCl-ekstrakta. 9-og dana čuvanja, za sve četiri vrste ekstrakta dolazi do pada koagulacione aktivnosti, s tim što se može primetiti da je taj pad za ekstrakte čuvane u zamrzivaču manji (za vodeni ekstrakt čuvan u zamrzivaču to smanjenje koagulacione aktivnosti iznosi 17%, a za NaCl-ekstrakt čuvan u zamrzivaču 16%) u odnosu na ekstrakte čuvane u frižideru, gde je postignuta koagulaciona aktivnost oko 0%. S obzirom na skoro identično ponašanje ekstrakata čuvanih u zamrzivaču, i na to da se ne očekuje neka promena u sastavu ovih ekstrakata na temperaturi čuvanja, pa time ni promena u aktivnosti, pad njihove koagulacione aktivnosti se takođe može pripisati variranju parametara vodovodske vode, a time i model vode koja je od nje pripremana. Što se tiče ekstrakata čuvanih u frižideru, i kod njih se primećuje skoro identično ponašanje, ali je pad koagulacione aktivnosti kod njih drastičan, tako da se ne može objasniti samo promenom parametara vodovodske vode, već i promenama u sastavu samih ekstrakata, koje su posledica dekompozicije organskih materija prisutnih u njima od strane mikroorganizama, a što je već svakako očekivana pojava za ekstrakte čuvane u frižideru 9 dana. Prasad i saradnici (2009) su utvrdili pad aktivnosti ekstrakata *M. oleifera*-e čuvanih na +4°C već 5-og dana čuvanja.

Nakon 9-og dana koagulaciona aktivnost sva četiri ispitivana ekstrakta počinje da raste. Ovo ponašanje je lako razumljivo kada se radi o ekstraktima čuvanim u zamrzivaču, za koje je već rečeno da se pretpostavlja da na temperaturi čuvanja ne dolazi do mikrobiološke razgradnje, odnosno da koagulaciona aktivnost u tom slučaju zavisi samo od varijacija u sastavu vodovodske vode, što se može potvrditi i činjenicom da je koagulaciona aktivnost i vodenog i NaCl-ekstrakta čuvanih u zamrzivaču, uz manja variranja, relativno ujednačena tokom ukupnog perioda ispitivanja. Takođe, tokom rada koji je usledio nakon ovih eksperimenata, a koji je trajao u dužem vremenskom periodu (2 – 3 godine), pripremljeni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču, pri čemu nije primećena značajnija promena njihove efikasnosti.

Što se tiče ekstrakata čuvanih u frižideru, oni su svakako podložni kvarenju, tj. mikrobiološkoj razgradnji, pa se pad njihove koagulacione aktivnosti od 7-og do 9-og dana može delom objasniti variranjem sastava vodovodske vode (jer i ekstrakti čuvani u zamrzivaču imaju pad aktivnosti u istom periodu i istoj model vodi), a drugim delom upravo mikrobiološkom razgradnjom. Naime, mikroorganizmi će svojim delovanjem razgrađivati krupne molekule koagulanata u sitnije molekulske frakcije, čime će oni gubiti svoju prvobitnu aktivnost. Ipak, nakon 9-og dana dolazi do obnove koagulacione aktivnosti, što se potencijalno može objasniti na sledeći način: nakon razgradnje prvobitnih molekula koagulanta od strane mikroorganizama, nastaje veći broj nekih novih molekula, koji takođe mogu nositi naelektrisane grupe, i za čiju aktivnost dati uslovi sredine nisu optimalni, pa izostaje i koagulaciona aktivnost; ovakva razgradnja molekula se nastavlja, pa će se u nekom momentu obrazovati molekuli kojima će uslovi sredine odgovarati, i time se koagulaciona aktivnost obnavlja. Ovo bi bilo samo jedno uprošćeno objašnjenje, jer je posmatrani sistem veoma kompleksan, i pored kontinuirane promene sastava ekstrakta usled rasta mikroorganizama, u 9-om danu su u matriksu u znatnoj količini svakako prisutni i produkti njihovog rasta, pa i oni mogu uticati na efikasnost samog ekstrakta. Iako su ekstrakti čuvani u frižideru do 13-og dana povratili svoju aktivnost, u ovom momentu su eksperimenti završeni s

obzirom na to da je na površini ekstrakata postojala uočljiva skrama mikroorganizama, što je bilo praćeno veoma neprijatnim mirisom. S.C. Dörries (2005) je takođe utvrdio da je vodeni ekstrakt *M. oleifera*-e nestabilan, i da je njegovo produženo čuvanje dovelo do pojave belog taloga na dnu posude za čuvanje. Rezultati SDS-PAGE elektroforeze su ukazali na značajne razlike u sastavu čak i nakon samo 2 dana posle pripreme ekstrakata – u sveže pripremljenim ekstraktima proteini većih molekulskih masa su detektovani samo tokom prvih dva dana čuvanja na +4°C, a kasnije je rasla koncentracija proteina manjih molekulskih masa.

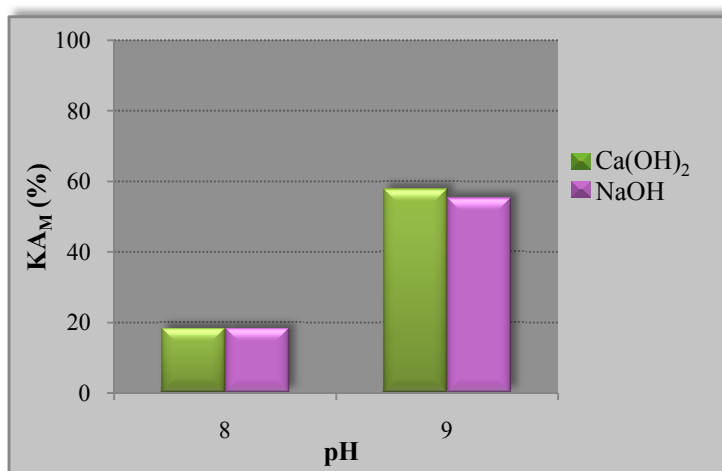
S obzirom na rezultate ovih ispitivanja, tj. nepredvidivost procesa koji se dešavaju tokom razgradnje u ekstraktima čuvanim u frižideru, pa samim time i koagulacione aktivnosti, pripremljeni koagulantni su u daljem radu zamrzavani, i tako čuvani do samog izvođenja eksperimenata.

#### 4.5. UTICAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA KOAGULACIJU PRIRODNIM KOAGULANTIMA IZ PASULJA

U poglavlju 2. Pregled dosadašnjih istraživanja je već izneto da je proces koagulacije/flokulacije veoma osetljiv, te da zavisi od brojnih parametara, kao što su pH i početna mutnoća model vode, primenjena doza koagulanta, brzina i vreme trajanja brzog i sporog mešanja. Cilj eksperimenata izvedenih u ovom delu rada je bio da se ispita uticaj različitih parametara na proces koagulacije/flokulacije, odnosno na koagulacionu aktivnost.

##### 4.5.1. Uticaj različitih sredstava za podešavanje pH model vode na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja

Za podešavanje pH vrednosti model vode u eksperimentima izvedenim u okviru ovog rada na raspolaganju su bili: rastvor HCl za niže pH vrednosti i rastvori NaOH i  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  za postizanje viših pH vrednosti. Stoga je u narednom eksperimentu provereno da li rastvori NaOH i  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  utiču na koagulacionu aktivnost primenjenog vodenog ekstrakta pasulja, tj. da li postoji razlika u koagulacionoj aktivnosti kada se kao sredstva za podešavanje baznog pH koriste ova dva rastvora. Ekstrakcija iz pasulja je izvedena sa destilovanom vodom pri odnosu 1:100, u trajanju 10 minuta, a testovi koagulacije sa dobijenim ekstraktom su izvedeni u model vodi početne mutnoće 35 NTU, na pH 8 i 9, i pri dozi ekstrakta 3 ml/l. Rezultati su prikazani na Slici 26.



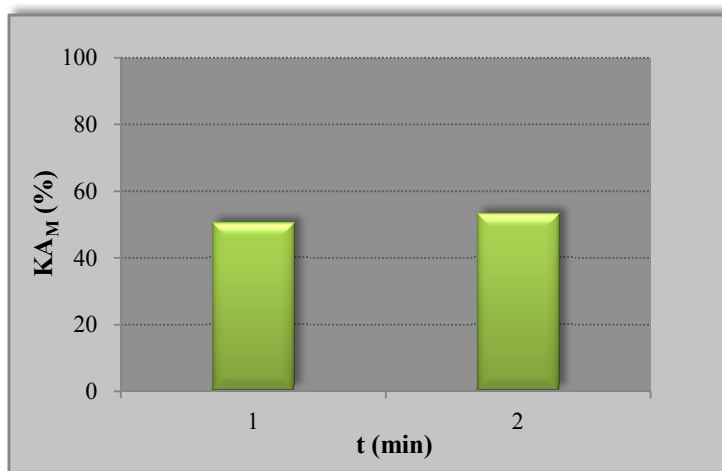
Slika 26. Uticaj sredstva za podešavanje baznog pH model vode na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta pasulja

Sa slike se vidi da je koagulaciona aktivnost veoma niska na pH 8, i znatno viša na pH 9. Takođe, nije primećena značajnija razlika u koagulacionoj aktivnosti kada su korišćena različita sredstva za podešavanje pH, pa je u narednim ispitivanjima u tu svrhu primenjivan rastvor NaOH, s obzirom da je jednostavniji za rad u laboratorijskim ispitivanjima.

#### 4.5.2. Uticaj dužine brzog mešanja na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja

Mešanje predstavlja esencijalni korak u procesu koagulacije/flokulacije, tokom koga se dodati koagulant/flokulant ravnomerno distribuiraju po celoj zapremini suspenzije. Veoma je važno da ovo bude izvedeno brzo, jer se, u suprotnom, lokalno javljaju povišene koncentracije koagulant/flokulant, što će dovesti do neuniformne adsorpcije i neke od suspendovanih čestica mogu biti restabilizovane na taj način, kao posledica adsorbovanja prevelikog broja molekula polimera. Nedovoljno dobro mešanje se smatra mogućim uzrokom povećane rezidualne mutnoće u vodi nakon koagulacije/flokulacije i sedimentacije (Bolto and Gregory, 2007). Uopšteno, poželjno je postići visoko turbulentne uslove, mada, velika sila smicanja u takvim uslovima može pokidati neke od molekula polimera. U praksi je velika verovatnoća da će uslovi tokom faze brzog mešanja imati značajan uticaj na proces koagulacije/flokulacije.

S obzirom na ovakav značaj mešanja u narednom ogledu je ispitan uticaj trajanja brzog mešanja na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja (dobijenog ekstrakcijom sa destilovanom vodom pri ekstrakcionom odnosu 1:100) u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9, pri primenjenoj dozi 3 ml/l. Rezultati su prikazani na Slici 27, odakle se vidi da se produžavanjem trajanja brzog mešanja sa 1 minuta na 2 minuta koagulaciona aktivnost neznatno menja, tako da je za dalje eksperimente usvojeno trajanje brzog mešanja od 1 minuta.

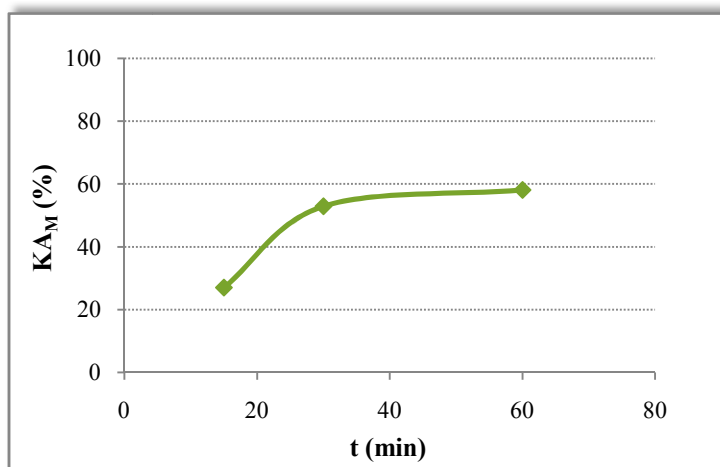


Slika 27. Uticaj trajanja brzog mešanja na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta pasulja

#### 4.5.3. Uticaj dužine sporog mešanja na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja

Cilj sporog mešanja je da se unošenjem kinetičke energije u sistem u kome su čestice prethodno destabilizovane poveća broj njihovih sudara, i time stimuliše flokulacija. Ova faza mešanja se, po pravilu, izvodi pri manjoj brzini nego prethodna da ne bi došlo do razbijanja flokula pod velikom silom smicanja. Takođe, ona se izvodi duže kako bi se dalo dovoljno vremena da čestice dođu u kontakt i obrazuju dovoljno krupne i stabilne flokule, koje će se onda lako izdvajati sedimentacijom.

U ogledu čiji su rezultati prikazani na Slici 28, ispitan je uticaj trajanja sporog mešanja na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta pasulja (ekstragens destilovana voda; ekstrakcioni odnos 1:100) u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9, pri dozi ekstrakta 3 ml/l.

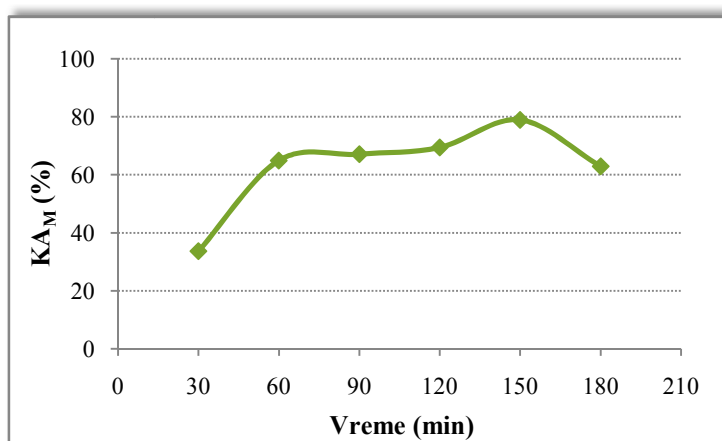


Slika 28. Uticaj trajanja sporog mešanja na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta pasulja

Iz rezultata se može zaključiti da je dužina sporog mešanja izuzetno važna, jer se za vreme od 15 minuta postiže duplo niža koagulaciona aktivnost nego za vreme mešanja od 30 minuta. Za vreme mešanja od 60 minuta koagulaciona aktivnost je samo nešto malo viša u odnosu na onu postignutu za vreme mešanja od 30 minuta, pa se za dalja ispitivanja usvaja dužina sporog mešanja od 30 minuta.

#### 4.5.4. Određivanje optimalnog vremena taloženja

Nakon obrazovanja flokula i završetka mešanja, potrebno je ostaviti dovoljno vremena flokulama da se istalože. U sledećem ogledu koagulacije, koji je izveden u model vodi početne mutnoće 220 NTU, na pH 5,5 i pri dozi NaCl-ekstrakta pasulja (dobijen pri ekstrakcionom odnosu 1:20) 0,4 ml/l, je ispitana zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta od vremena taloženja. Nakon izvedenog džar testa, probe su ostavljene u cilindrima na taloženju 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta. Paralelno su postavljene i odgovarajuće slepe probe. Rezultati su prikazani na Slici 29.



Slika 29. Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od vremena taloženja

Sa grafika se vidi da se maksimalna koagulaciona aktivnost postiže za vreme taloženja od 150 minuta. Ipak, kao optimalno vreme taloženja je usvojeno vreme od 1 h jer se za to vreme postiže nešto manja efikasnost za više nego duplo kraće vreme.

#### 4.5.6. Odnos početne mutnoće model vode i primenjene doze koagulanta

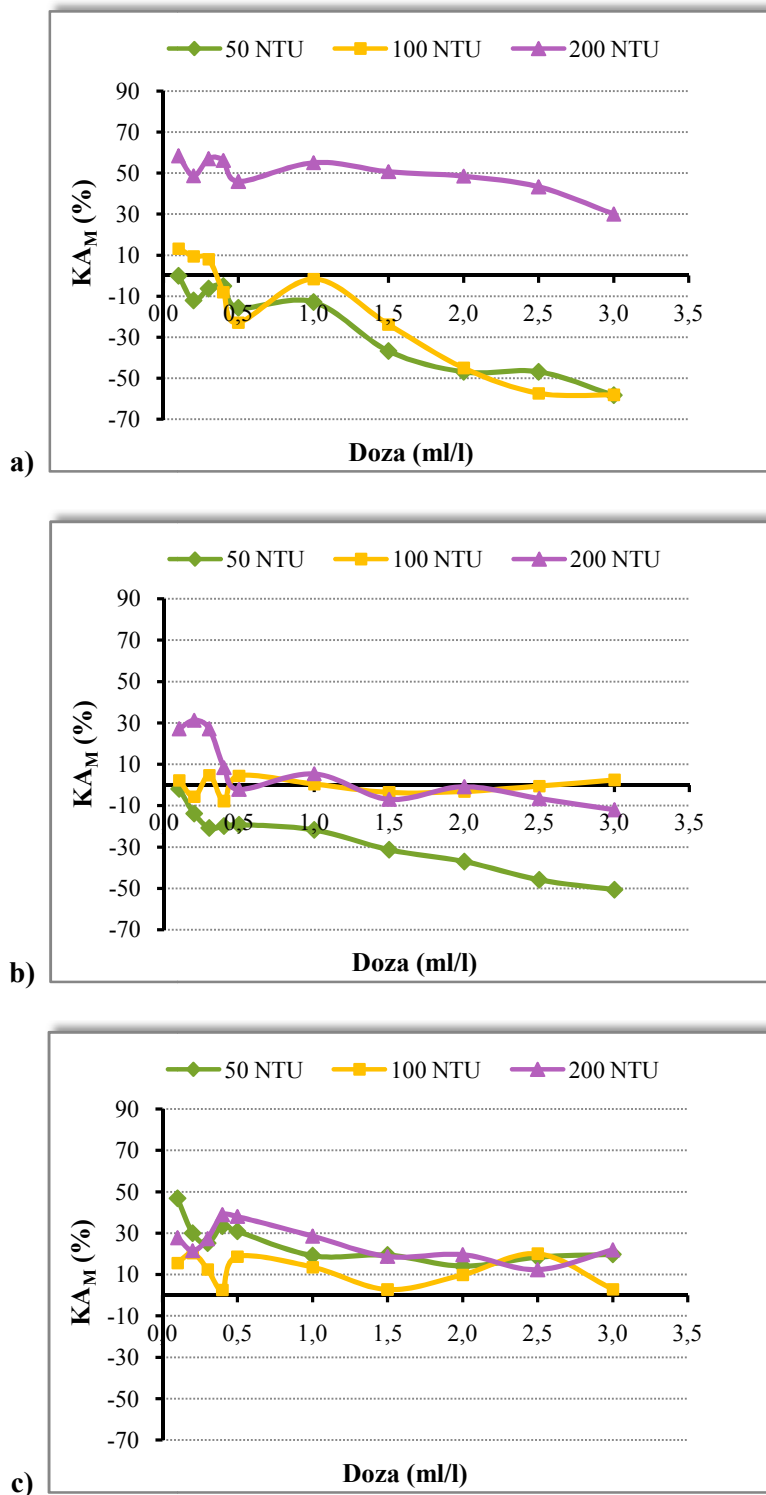
Optimalan odnos između količine suspendovanih čestica (početne mutnoće vode koja se obrađuje) i količine koagulanta (doza koagulanta) je takođe jedan od ključnih parametara za efikasno izvođenje procesa koagulacije. Osnovni uslov za obrazovanje flokula je da postoji dovoljno slobodne površine na česticama za adsorbovanje segmenata lanaca polimera adsorbovanih na druge čestice (poglavlje 2.1.2.2.). Iz toga sledi da adsorbovana količina polimera ne treba da bude prevelika, jer će u tom slučaju površina čestica postati toliko pokrivena, da će preostati nedovoljan broj mesta za povezivanje sa drugim česticama. Tada se javlja fenomen restabilizacije čestica. S druge strane, adsorbovana količina polimera ne treba da bude ni preniska, jer se tada neće ostvariti dovoljan broj povezivanja sa drugim česticama i neće se obrazovati flokule dovoljno dobrih karakteristika. Ovakvo razmatranje dovodi nas do ideje o optimalnoj dozi za datu vodu (tj. količinu suspendovanih čestica u njoj), odnosno o optimalnom odnosu početne mutnoće vode i doze koagulanta.

U narednoj grupi eksperimenata ispitivan je upravo odnos početne mutnoće model vode (pri različitim pH vrednostima model vode) i primenjene doze vodenog ekstrakta pasulja (Slika 30) i primenjene doze NaCl-ekstrakta pasulja (Slika 31). Vodeni ekstrakt je dobijen ekstrakcijom sa vodom pri odnosu 1:20, a NaCl-ekstrakt pasulja ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri odnosu 1:20.

Sa Slike 30a) se može videti da je u model vodama početnih mutnoća 50 i 100 NTU koagulaciona aktivnost negativna ili zanemarljivo mala čak i pri najnižoj primenjenoj dozi ekstrakta od 0,1 ml/l. Kako se primenjena doza ekstrakta povećava u ove dve model vode, trend je da se mutnoća obrađene vode povećava i, usled toga, koagulaciona aktivnost smanjuje. Sve ovo govori u prilog tezi da je u ovim model vodama količina suspendovanih čestica suviše mala u odnosu na dodatnu količinu koagulanta, pa se u model vodi početne mutnoće 100 NTU do doze 0,4 ml/l postiže neka mala koagulaciona aktivnost, dok sa daljim povećanjem doze, količina dodatog koagulanta postaje toliko velika da čestice bivaju restabilizovane, odnosno rezidualna mutnoća tretiranih uzoraka je veća od rezidualne mutnoće slepe probe gde nije dodavan koagulant (negativna koagulaciona aktivnost). U model vodi početne mutnoće 50 NTU, već i najniža doza koagulanta je previsoka u odnosu na prisutan broj suspendovanih čestica, pa su one već tada restabilizovane i ne odvija se koagulacija. Kada se početna mutnoća model vode značajnije poveća (model voda početne mutnoće 200 NTU), počinje da se odvija proces koagulacije i dostiže se maksimalna koagulaciona aktivnost 58,4%. U ovoj model vodi koagulaciona aktivnost je približno ista u širokom opsegu doza. Povećavanjem doze sa 0,1 ml/l do 2,5 ml/l, koagulaciona aktivnost se smanjuje samo za 10%. Maksimalna koagulaciona aktivnost je postignuta pri najmanjoj primenjenoj dozi ekstrakta (0,1 ml/l), pa se može pretpostaviti da bi sa manjom dozom efikasnost bistrenja bila i veća.

U model vodi čiji je pH 8 (Slika 30b), i pri početnoj mutnoći 50 i 100 NTU, u najvećem broju slučajeva ponovo izostaje koagulaciona aktivnost. Ono što je takođe vredno spomenuti, je da je pri ovoj pH vrednosti, čak i u model vodi početne mutnoće 200 NTU, koagulaciona aktivnost mala (maksimalno 31,3% pri dozi 0,2 ml/l), odnosno niža nego što je bila pri ovoj početnoj mutnoći model vode, na pH vrednosti 6. Sa povećanjem doze preko 0,2 ml/l, koagulaciona aktivnost u model vodi početne mutnoće 200 NTU dalje opada.

U model vodama čija je pH vrednost 10, pri svim ispitivanim početnim mutnoćama postoji pozitivna koagulaciona aktivnost (Slika 30c). Maksimalna efikasnost bistrenja je postignuta u model vodi početne mutnoće 50 NTU, pri dozi 0,1 ml/l, i iznosila je 46,9%. Približna koagulaciona aktivnost, a maksimalna za tu model vodu, je postignuta u model vodi početne mutnoće 200 NTU, pri dozi 0,4 ml/l, i iznosila je 39%.

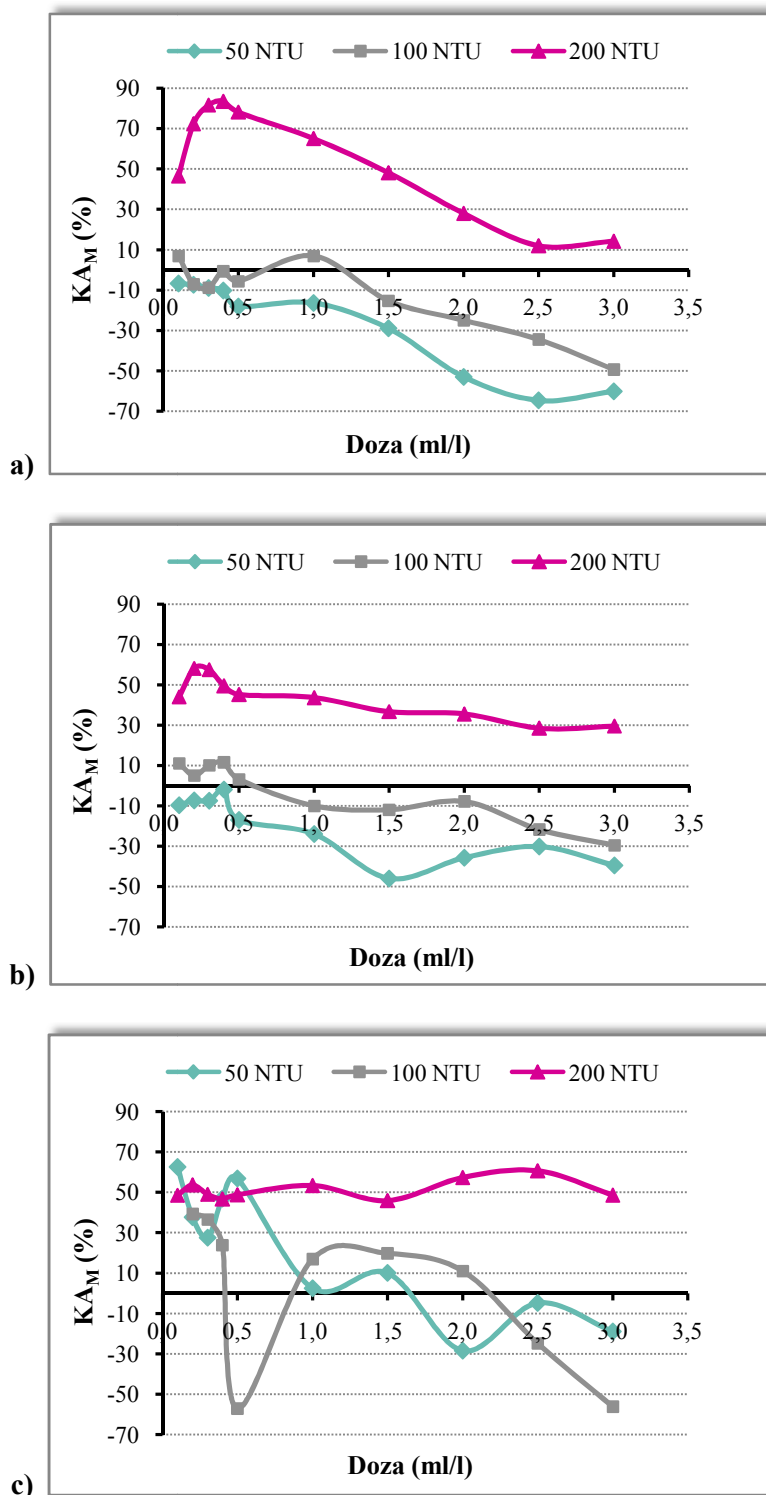


**Slika 30.** Uticaj primenjene doze na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta pasulja u model vodama različitih početnih mutnoća i pH vrednosti:

a) pH 6, b) pH 8 i c) pH 10



Što se tiče NaCl-ekstrakta pasulja, on se u ovim ogledima uopšteno pokazao kao znatno efikasniji od vodenog ekstrakta (Slika 31).



**Slika 31.** Uticaj primenjene doze na koagulacionu aktivnost NaCl-ekstrakta pasulja u model vodama različitih početnih mutnoća i pH vrednosti:  
a) pH 6, b) pH 8 i c) pH 10

Na pH vrednosti 6 (Slika 31a) je sličan slučaj kakav je bio kod vodenog ekstrakta. U model vodi početne mutnoće 50 NTU, pri svim primenjenim dozama ekstrakta, koagulaciona aktivnost je negativna. U model vodi početne mutnoće 100 NTU, pri nekim dozama

koagulaciona aktivnost je vrlo mala, a pri ostalim takođe negativna. Pri većoj početnoj mutnoći model vode, 200 NTU, koagulacija je znatno bolja. Koagulaciona aktivnost je pozitivna za sve primenjene doze ekstrakta, sa maksimumom od 83,5% pri dozi 0,4 ml/l, što bi u ovom slučaju bila optimalna doza.

Na pH vrednosti model vode 8 (Slika 31b), uslovi su nepovoljni za slučaj voda početnih mutnoća 50 i 100 NTU, kod kojih je koagulaciona aktivnost skoro u svim slučajevima negativna, a što se tiče model vode početne mutnoće 200 NTU, tu dolazi do pogoršanja u odnosu na koagulacionu aktivnost u ovoj model vodi na pH 6, jer je maksimalna postignuta koagulaciona aktivnost 58,1%. Takođe, može se primetiti razlika u ponašanju vodenog i NaCl-ekstrakta na ovoj pH vrednosti – naime, dok vodeni ekstrakt u sve tri model vode pokazuje nikakvu, ili nisku koagulacionu aktivnost, NaCl-ekstrakt u model vodi početne mutnoće 200 NTU postiže dobru koagulacionu aktivnost. U ovom smislu NaCl-ekstrakt se na pH 8 ponaša slično vodenom ekstraktu na pH 6.

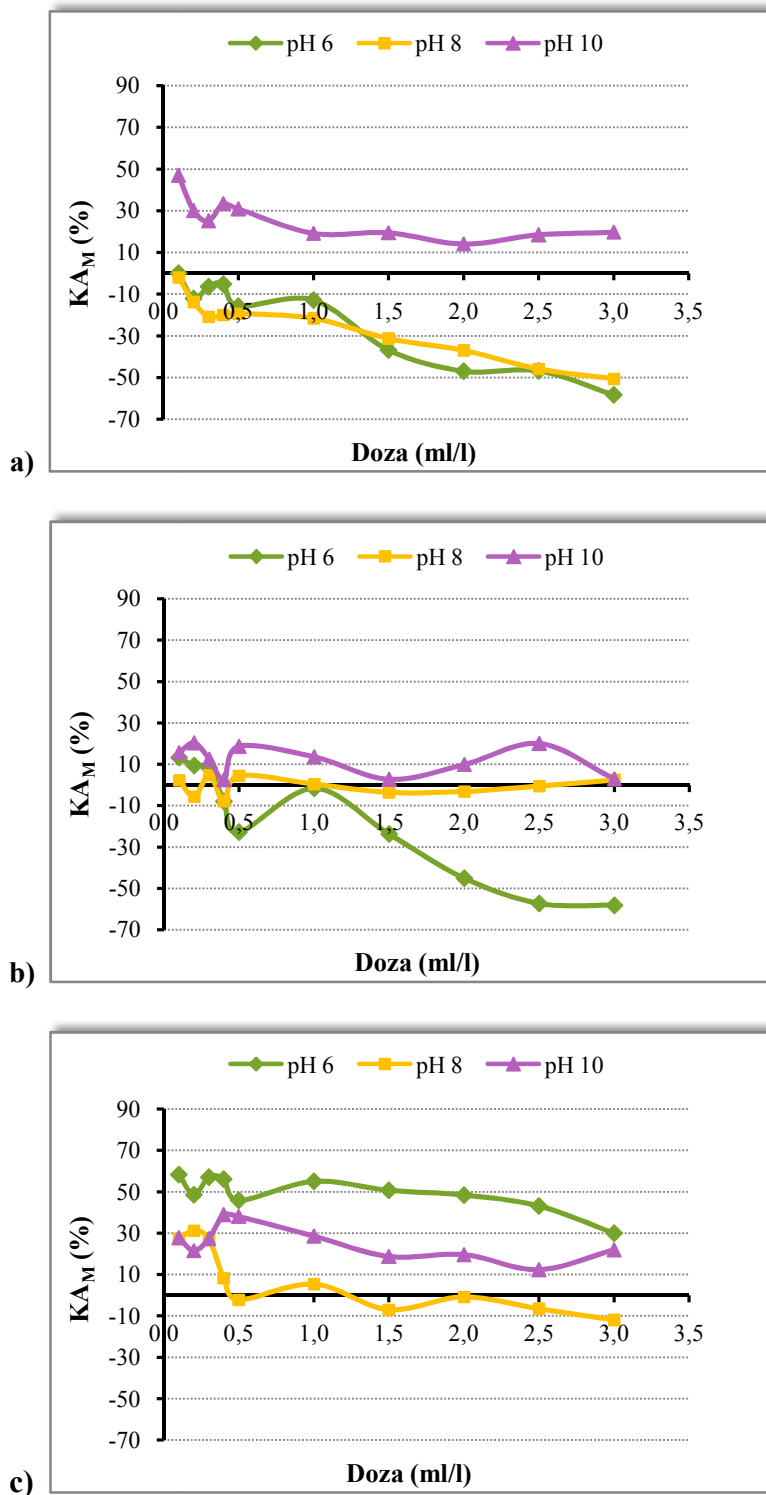
U model vodi čija je pH vrednost bila 10 (Slika 31c), maksimalna koagulaciona aktivnost je postignuta pri početnoj mutnoći model vode 50 NTU, pri minimalnoj primenjenoj dozi ekstrakta, 0,1 ml/l, i iznosila je 62,6%. Nešto niža koagulaciona aktivnost (53,7%) je postignuta pri dozi 0,2 ml/l u model vodi početne mutnoće 200 NTU, a ta doza je bila optimalna i za model vodu početne mutnoće 100 NTU, gde je postignuta efikasnost bistrenja 39,2%. Maksimalna koagulaciona aktivnost od 60,6%, u model vodi početne mutnoće 200 NTU, je postignuta pri dozi 2,5 ml/l. Ova koagulaciona aktivnost je približna onoj postignutoj u model vodi početne mutnoće 50 NTU, ali je optimalna potrebna doza čak 25 puta veća u tom slučaju. Ipak, u model vodi početne mutnoće 200 NTU koagulaciona aktivnost je približno ista u širokom opsegu primenjenih doza, tako da se i za dozu od 0,2 ml/l može reći da daje sasvim zadovoljavajuću koagulacionu aktivnost (53,7%), dok kod voda manje početne mutnoće ona jako varira, i tada se lako može „promašiti“ optimalna doza.

Iz prethodno iznetih rezultata može se izvesti jedan uopšten zaključak, a to je da i vodeni i NaCl-ekstrakt pasulja imaju bolju efikasnost u model vodama veće početne mutnoće. Do istih rezultata su došli i brojni istraživači koji su ispitivali prirodne koagulate iz *M. oleifera*-e (Muyibi and Okuofu, 1995; Muyibi and Evison, 1995b; Nkurunziza et al., 2009; Pritchard et al., 2009, Ghebremichael et al., 2009; Pritchard et al., 2010b). Muyibi i Okuofu (1995) su sa ekstraktom *M. oleifera*-e u uzorcima vode čija se mutnoća kretala u opsegu od 23 – 90 NTU postigli maksimalnu koagulacionu aktivnost od 50%, pa su sugerisali da ovaj ekstrakt možda nije pogodan koagulant za obradu slabo mutnih voda. U eksperimentima izvedenim u okviru ovog rada, u model vodama ovih početnih mutnoća je sa ekstraktom pasulja postignuta maksimalna koagulaciona aktivnost 62,6%. Pritchard i saradnici (2010b) su ispitujući efikasnost bistrenja vodenim ekstraktom *M. oleifera*-e u model vodama početnih mutnoća u opsegu od 40 – 200 NTU utvrdili da pri niskim dozama koagulanta koagulaciona aktivnost izostaje, ili je zanemarljiva, bez obzira na početnu mutnoću model vode. U slučaju i jednog i drugog ispitivanog ekstrakta pasulja situacija je drugačija – i pri niskim dozama koagulanta, a u zavisnosti od početne mutnoće model vode i njene pH vrednosti, postoji koagulaciona aktivnost, i čak se za većinu model voda određene početne mutnoće i pH vrednosti, maksimalna koagulaciona aktivnost javlja upravo pri tim niskim dozama.

#### 4.5.7. Uticaj pH vrednosti model vode na koagulacionu aktivnost ekstrakata pasulja

pH vrednost sredine je svakako jedan od ključnih faktora za efikasno bistrenje vode koagulacijom, posebno kada se radi o mehanizmu neutralizacije naelektrisanja. S obzirom da je u ovom radu reč o polielektrolitima, u zavisnosti od njihove izoelektrične tačke i pH

vrednosti vode koja se obrađuje, oni će biti manje ili više, pozitivno ili negativno naelektrisani. U cilju boljeg sagledavanja uticaja pH vrednosti model vode na koagulacionu aktivnost ekstrakata u model vodama različitih početnih mutnoća, rezultati iz poglavlja 4.5.6. su predstavljeni na drugi način, i za vodeni ekstrakt pasulja prikazani na Slici 32, a za NaCl-ekstrakt pasulja na Slici 33.



Slika 32. Uticaj pH vrednosti na koagulacionu aktivnost vodenog ekstrakta pasulja u model vodama različitih početnih mutnoća:

a) 50 NTU, b) 100 NTU i c) 200 NTU

U model vodi male početne mutnoće (50 NTU), na pH vrednosti 6 i 8, koagulaciona aktivnost vodenog ekstrakta pasulja je negativna za sve ispitivane doze (Slika 32a), što znači da ne dolazi do obrazovanja flokula, već dodati ekstrakt ostaje suspendovan u tretiranim vodama, povećavajući njihovu rezidualnu mutnoću. Na pH 10 postoji koagulaciona aktivnost, i najveća je (47%) pri najmanjoj primenjenoj dozi ekstrakta 0,1 ml/l, a zatim opada.

Sa povećanjem početne mutnoće model vode na 100 NTU (Slika 32b), koagulaciona aktivnost vodenog ekstrakta na pH 6 i pH 8 ostaje uglavnom negativna, dok na pH 10 i dalje postoji koagulaciona aktivnost čiji se maksimum kreće oko 20%.

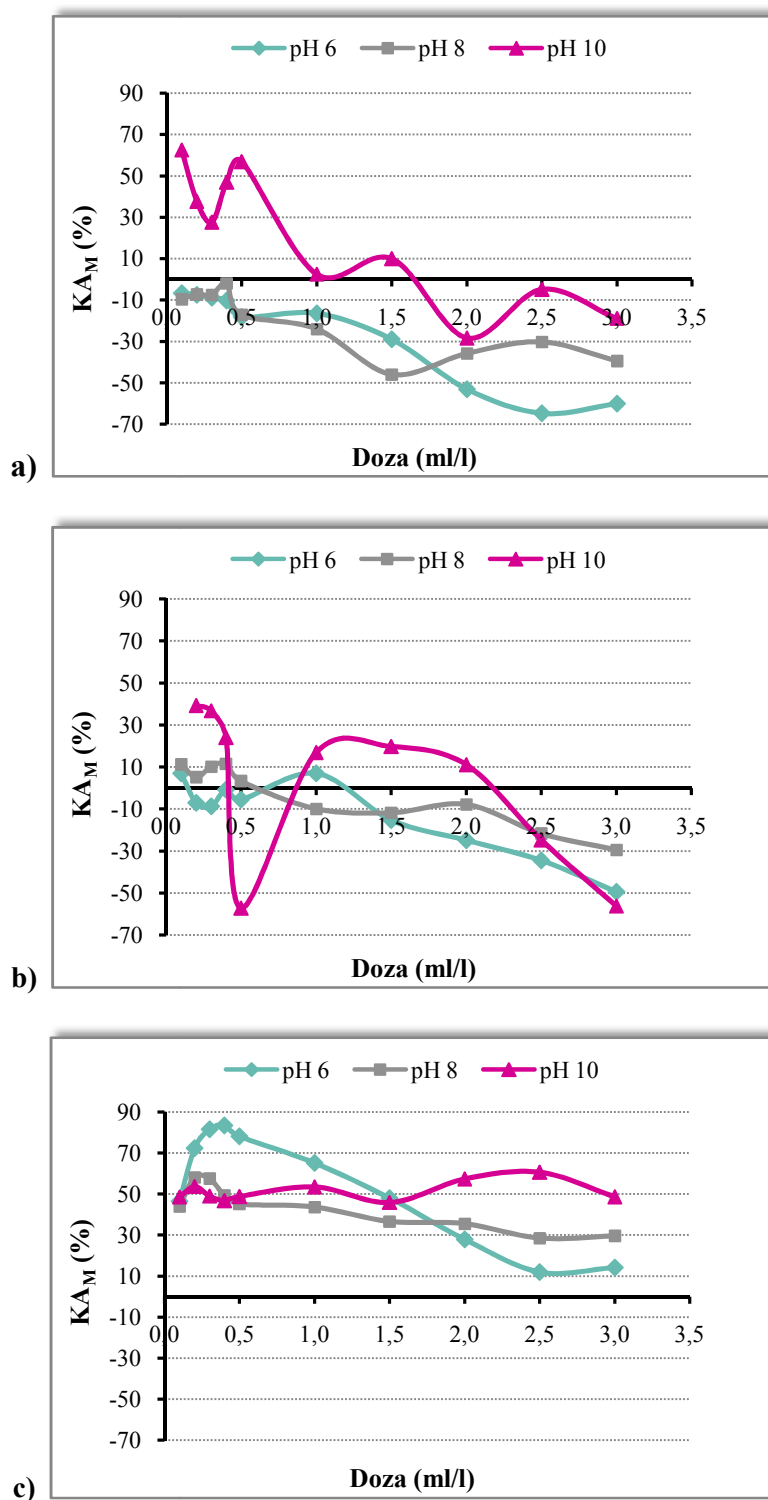
U model vodi velike početne mutnoće, 200 NTU (Slika 32c), na pH 8 koagulaciona aktivnost je relativno niska, na pH 10 dostiže maksimum od oko 39% pri dozi 0,4 ml/l. Pri ovoj početnoj mutnoći, vodeni ekstrakt pasulja je najveće koagulacione aktivnosti postigao u model vodi čija je pH vrednost 6, sa maksimumom od 58,4% pri minimalnoj primenjenoj dozi 0,1 ml/l.

Što se tiče NaCl-ekstrakta pasulja, u model vodi početne mutnoće 50 NTU (Slika 33a), na pH vrednostima 6 i 8 je koagulaciona aktivnost takođe bila negativna, kao što je bio slučaj i kod primene vodenog ekstrakta u ovim model vodama. Na pH vrednosti 10, maksimalna koagulaciona aktivnost NaCl-ekstrakta je postignuta pri dozi 0,1 ml/l, i iznosila je 62,6%.

U model vodi početne mutnoće 100 NTU (Slika 33b) na pH 6 i 8 je koagulaciona aktivnost ovog ekstrakta nešto bolja nego što je bio slučaj na ovim pH vrednostima u prethodnoj model vodi, ali ipak je još uvek zanemarljiva (negede oko 10%). Na pH vrednosti 10, maksimalna koagulaciona aktivnost u ovoj model vodi je iznosila oko 39%, pri dozi 0,2 ml/l.

U model vodi početne mutnoće 200 NTU (Slika 33c), na svim pH vrednostima, koagulaciona aktivnost NaCl-ekstrakta je bila pozitivna. Na pH 8 i 10, maksimalana koagulaciona aktivnost je približno jednaka, oko 60%. Ekstrakt se najbolje pokazao na pH vrednosti 6, postigavši maksimalnu koagulacionu aktivnost 83,5% pri dozi 0,4 ml/l.

Kada se sagledaju zajedno rezultati vezani za ispitivanje optimalne doze koagulantu u odnosu na početnu mutnoću model vode i optimalne pH vrednosti model vode (Slike 30, 31, 32 i 33), može se izvesti nekoliko uopštenijih zaključaka za oba ispitivana ekstrakta: ekstraktima pasulja više odgovaraju model vode velike početne mutnoće (200 NTU), u kojima postižu maksimalne koagulacione aktivnosti; u ovim model vodama, ekstraktima više odgovara niža pH vrednost (pH 6), kada pri veoma niskim dozama postižu maksimum efikasnosti; ukoliko se radi o model vodama male početne mutnoće, tada koagulantima više odgovara visoka pH vrednost (pH 10), ali tada se koagulaciona aktivnost pre, ili većim delom, može pripisati delimičnom izdvajanju  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na ovoj pH vrednosti, nego samoj aktivnosti koagulanata; srednje pH vrednosti (pH 8) ne odgovaraju koagulantima koji se nalaze u ekstraktima pasulja. Ovakvi rezultati se delimično slažu sa opisanim ponašanjem ekstrakta *M. oleifera-e* (Pritchard et al., 2010b), koji ima nisku efikasnost pri ekstremnim pH vrednostima, a maksimalnu oko neutralnog pH (na pH 6,5). Ipak, neko ozbiljnije poređenje u ovom smislu nije moguće, s obzirom na to da ekstrakti ispitivani u ovom radu i drugim radovima sadrže različite koagulanate (različit hemijski sastav, karakteristike, izoelektrična tačka), kao i s obzirom na to da se i sami rezultati vezani za ekstrakte *M. oleifera-e*, u smislu optimalnog pH, veoma razlikuju od rada do rada.

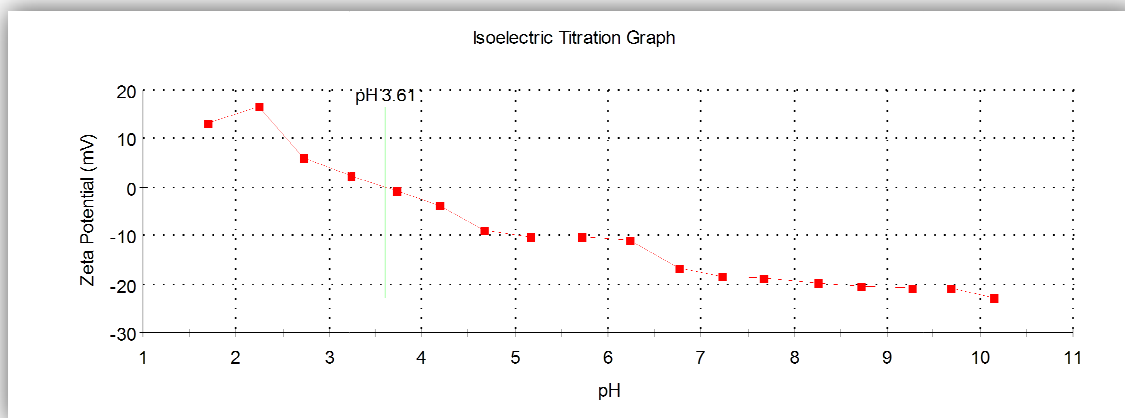


Slika 33. Uticaj pH vrednosti na koagulacionu aktivnost NaCl-ekstrakta pasulja u model vodama različitih početnih mutnoća: a) 50 NTU, b) 100 NTU i c) 200 NTU

#### 4.6. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA JONOIZMENJIVAČKOM HROMATOGRAFIJOM

Prirodni koagulantni su organska jedinjenja, pa njihovim dodavanjem u vodu koja se obrađuje koagulacijom, može doći do povećanja sadržaja organskih materija. U poglavlju 2.,

Pregled dosadašnjih istraživanja, su izneti podaci iz različitih istraživanja vezani za uticaj prirodnih koagulanata na sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi, koji ukazuju na njihov značajan uticaj na ovaj parametar. Organske materije mogu dovesti do pojave boje, ukusa i mirisa vode, do rasta mikroorganizama, i što je najvažnije do obrazovanja veoma štetnih nus-proizvoda dezinfekcije, pogotovo ukoliko se ona izvodi hlorom. Zbog toga je potrebno pronaći pogodne načine za prečišćavanje prirodnih koagulanata, kako bi se na taj način uklonile materije koje ne poseduju koagulacionu aktivnost, a doprinose povećanju sadržaja organskih materija. U prvoj grupi eksperimenata vezanih za prečišćavanje prirodnih koagulanata, prečišćavanje sirovog ekstrakta pasulja je izvedeno na izmenjivačima jona. Prečišćavanje je izvedeno šaržno ili kolonskom hromatografijom. Određivanjem zeta potencijala sirovog ekstrakta pasulja sa promenom pH (dijagram prikazan na Slici 34) je utvrđeno da je njegova izoelektrična tačka na pH vrednosti 3,61. S obzirom na ovakvu izoelektričnu tačku i na pH vrednosti na kojima je planirano hromatografsko razdvajanje (pH vrednosti iznad 5), za očekivati je da većina proteina bude negativno naelektrisana, i da se time vezuje na anjonite. Ipak, u sirovom ekstraktu pasulja, čija je izoelektrična tačka 3,61, se pored proteina, nalaze i druge organske materije (ugljeni hidrati, fitinska kiselina, lipidi i dr.) koje sve zajedno doprinose ovako niskoj izoelektričnoj tački, što može značiti da u smeši ima (u manjem procentu) i proteina sa višom izoelektričnom tačkom, koji će onda na radnim pH vrednostima biti naelektrisani pozitivno, i vezivati se na katjonite. Stoga su ovde proteini izdvajani (zatim i ispitivani) kako na katjonitima, tako i na anjonitima. Pre prečišćavanja na jonoizmenjivačima, proteini su izdvajani iz sirovog ekstrakta taloženjem sa amonijum-sulfatom po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1. Od katjonita su za prečišćavanje primenjeni Amberlite™ IR 120Na i Wofatit, a od anjonita Amberlite™ IRA 900Cl i Amberlite™ IRA 958Cl.



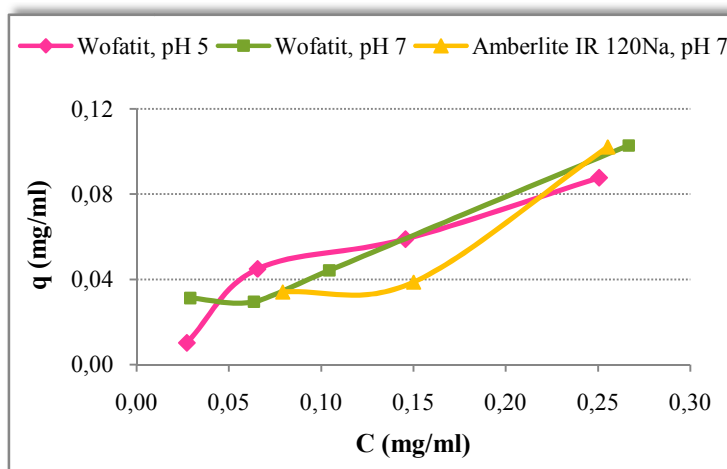
Slika 34. Zavisnost zeta potencijala u sirovom ekstraktu pasulja od pH vrednosti

#### 4.6.1. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na katjonitima Amberlite™ IR 120Na i Wofatit (šaržno)

Amberlite™ IR 120Na je jako kiseli katjonit sa lako pokretnim jonom  $\text{Na}^+$ . Ova jonoizmenjivačka smola se odlikuje dobrom fizičkom, hemijskom i toplotnom stabilnošću, dobrom kinetikom izmene jona i velikim kapacitetom. Wofatit je neutralni katjonit.

U prvom delu ispitivanja je izvedeno vezivanje proteina dijalizata (dijalizat dobijen taloženjem proteina iz sirovog ekstrakta pasulja dobijenog ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri ekstrakcionom odnosu 1:20) za obe jonoizmenjivačke smole, uz variranje

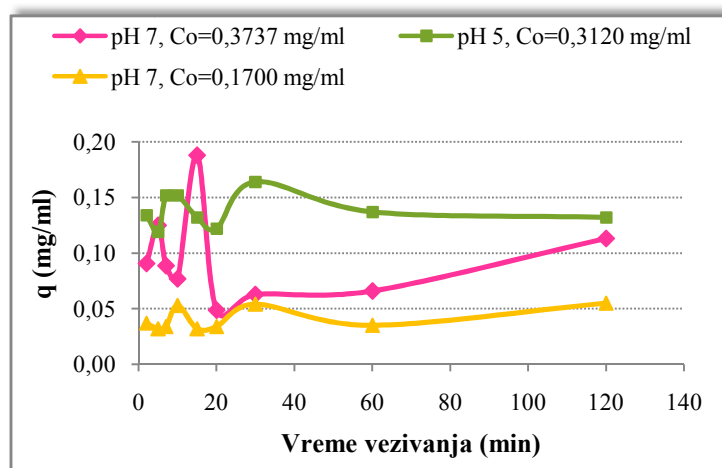
pH vrednosti 0,1 mol/l fosfatnog pufera korišćenog za razblaživanje dijalizata. Na Slici 35 je prikazana zavisnost količine proteina vezanih za jonoizmenjivačke smole i preostale ravnotežne koncentracije proteina u rastvoru.



**Slika 35.** Zavisnost količine proteina vezanih za jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IR 120Na i Wofatit i preostale koncentracije proteina u rastvoru, u ravnoteži

Sa Slike 35 se vidi da se proteini iz rastvora slično vezuju za obe vrste jonoizmenjivačkih smola, i da pH vrednost rastvora u ispitivanom opsegu nema značaja za vezivanje proteina. Za dalje ispitivanje je izabrana smola Wofatit i pH vrednost 7.

U sledećem ogledu je praćena kinetika vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu Wofatit. Ogled je izveden tako da su za jonoizmenjivačku smolu vezivani proteini iz razblaženog dijalizata uz mešanje, pri zapreminskom odnosu smola : dijalizat = 1:1. U određenim vremenskim razmacima je u dijalizatu određivan sadržaj preostalih proteina, i na osnovu toga računata efikasnost vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu u zavisnosti od vremena vezivanja. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 36.

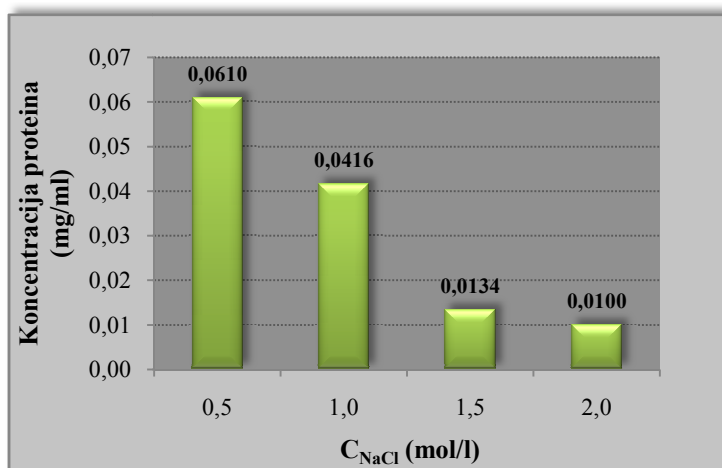


**Slika 36.** Zavisnost količine proteina vezanih za jonoizmenjivačku smolu Wofatit (pri različitim početnim koncentracijama proteina) od vremena kontakta rastvora i smole

Sa grafika se može primetiti da je vezivanje u početku nestabilno, a zatim se nakon nekog vremena stabilizuje, pa se efikasnost vezivanja kasnije kreće oko približno istih

vrednosti. Najveća količina proteina se veže za smolu u prvih 30 minuta, pa je ovo vreme kontakta odabrano za dalje eksperimente. pH vrednost pufera korišćenog za razblaživanje dijalizata znatno utiče na vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu.

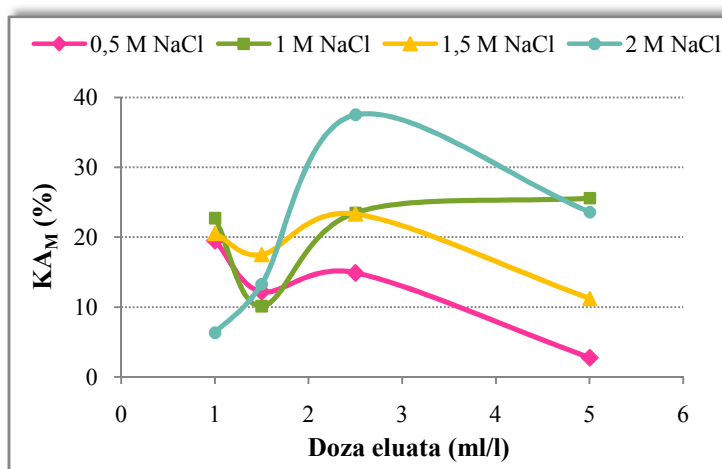
U sledećem koraku proteini iz dijalizata su prvo vezani za jonoizmenjivačku smolu, nakon čega je ona ispirana 30 minuta fosfatnim puferom u zapreminskom odnosu smola : pufer = 1:1. Posle ispiranja izvedeno je sukcesivno eluiranje vezanih proteina rastvorima NaCl rastuće koncentracije (kako je opisano u poglavlju 3.2.1.1.), i u eluatima je određen sadržaj proteina, što je prikazano na Slici 37.



**Slika 37.** Koncentracija proteina u eluatima u zavisnosti od koncentracije rastvora NaCl kojima je izvedeno eluiranje sa jonoizmenjivačke smole Wofatit (u šaržnim uslovima)

Sa histograma se jasno vidi da je najviše proteina eluirano rastvorom NaCl koncentracije 0,5 mol/l, a da sa daljim porastom njegove jonske jačine opada količina proteina u eluatima.

Nakon eluiranja proteina sa jonoizmenjivačke smole, ispitana je njihova koagulaciona aktivnost pri različitim dozama u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9 (vrednosti izabrane na osnovu literaturnih podataka – Okuda et al., 2001a), a rezultati su prikazani na Slici 38.



**Slika 38.** Koagulaciona aktivnost eluata (dobijenih eluiranjem sa jonoizmenjivačke smole Wofatit) u zavisnosti od primenjene doze

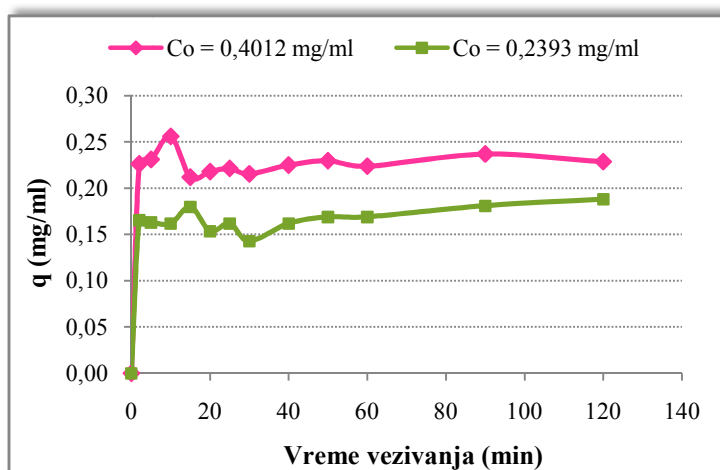


Sa grafika (Slika 38) se može zaključiti sledeće: za eluate dobijene eluiranjem sa 0,5 mol/l, 1 mol/l i 1,5 mol/l rastvorom NaCl u ispitivanom opsegu doza, optimalna doza je najniža primenjena doza – 1 ml/l, kada se njihova koagulaciona aktivnost kreće oko 20%. Što se tiče eluata dobijenog eluiranjem sa 2 mol/l rastvorom NaCl, njegova maksimalna koagulaciona aktivnost se postiže sa dozom koja je 2,5 puta veća, što je i logično s obzirom na to da je koncentracija proteina u ovom eluatu 6 puta niža u odnosu na eluat dobijen sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl. Najveću koagulacionu aktivnost je pokazao upravo ovaj eluat, blizu 40%.

#### 4.6.2. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitima: Amberlite™ IRA 958Cl (šaržno)

Amberlite™ IRA 958Cl je jako bazna makroretikularna jonoizmenjivačka smola sa lako pokretnim  $\text{Cl}^-$  jonom. Odlikuje se velikom otpornošću na organski fouling, visokom efikasnošću vezivanja velikih molekula prirodnih organskih materija i velikom otpornošću na fizička oštećenja usled habanja i osmotskog šoka.

Kako bi se došlo do podatka o optimalnom vremenu vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu, potrebno je pratiti kinetiku vezivanja, odnosno količinu vezanih proteina po jedinici zapremine jonoizmenjivačke smole u zavisnosti od vremena kontakta dijalizata i smole. S tim ciljem je dijalizat dobijen taloženjem proteina iz sirovog ekstrakta pasulja (ekstrakcija izvedena sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri ekstrakcionom odnosu 1:20) razblažen 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) tako da su dobijena dva rastvora sa početnim koncentracijama proteina 0,4012 mg/ml i 0,2393 mg/ml. Ova dva rastvora su mešana sa jonoizmenjivačkom smolom u zapreminskom odnosu 1:1, i u periodu od 120 minuta je praćena količina vezanih proteina. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 39.

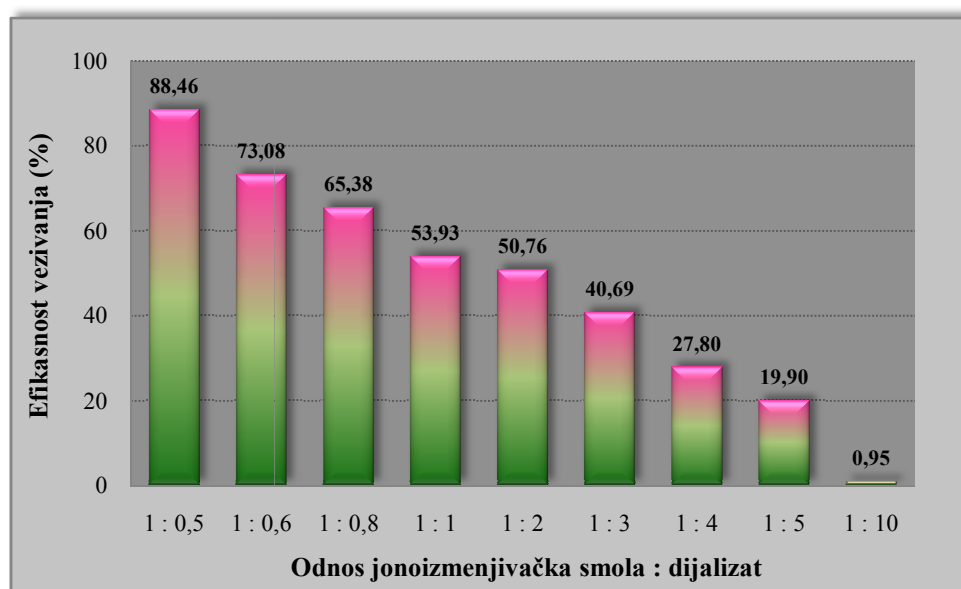


**Slika 39.** Zavisnost količine proteina vezane za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl od vremena kontakta smole i rastvora pri različitim početnim koncentracijama proteina u rastvoru

Iz podataka sa grafika se može zaključiti da se vezivanje proteina odigrava dosta brzo, ali i da je proces vezivanja nestabilan, pa nakon određenog vremenskog perioda dolazi do desorpcije proteina sa smole. Slično ponašanje prilikom vezivanja proteina je primećeno i u slučaju ispitivane katjonske jonoizmenjivačke smole Wofatit (Slika 36), s tim što je kod te jonoizmenjivačke smole vezivanje bilo još nestabilnije u poređenju sa anjonitom Amberlite™ IRA 958Cl. Najveća efikasnost vezivanja iz rastvora sa većom početnom koncentracijom

proteina se postiže u prvih 10 – 15 minuta, nakon čega blago opada i kreće se oko približno istih vrednosti, na osnovu čega je za dalji rad izabrano vreme od 15 minuta kao vreme kontakta jonoizmenjivačke smole i dijalizata. Pri većoj početnoj koncentraciji proteina u rastvoru za odabrano vreme kontakta, postignuta je efikasnost vezivanja 52,82%, dok je pri manjoj početnoj koncentraciji proteina ta efikasnost iznosila 75,12%.

Nakon određivanja optimalnog vremena kontakta jonoizmenjivačke smole i dijalizata, urađen je ogled koji je za cilj imao utvrđivanje optimalnog zapreminskog odnosa jonoizmenjivačke smole i dijalizata, u kome su smola i dijalizat mešani u različitim odnosima, a praćena je efikasnost vezivanja proteina za smolu nakon kontaktnog vremena od 15 minuta. S obzirom na rezultate ispitivanja kinetike vezivanja (Slika 39), dijalizat je razblažen 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) tako da početna koncentracija proteina u njemu iznosi oko 0,26 mg/ml. Rezultati eksperimenta su prikazani na Slici 40.

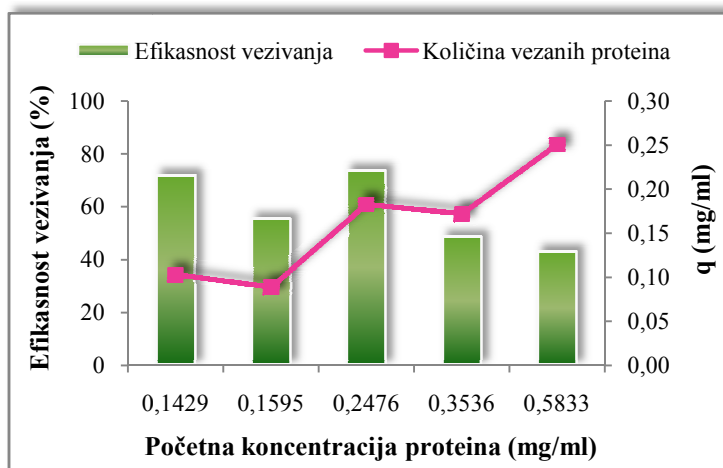


**Slika 40.** Zavisnost efikasnosti vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl od zapreminskog odnosa smola : dijalizat

Sa Slike 40 se vidi da sa povećanjem zapremine dijalizata efikasnost vezivanja opada, a najveća efikasnost vezivanja, 88,46%, je postignuta za zapreminski odnos smola : dijalizat = 1 : 0,5, pa se ovaj odnos usvaja za dalje eksperimente.

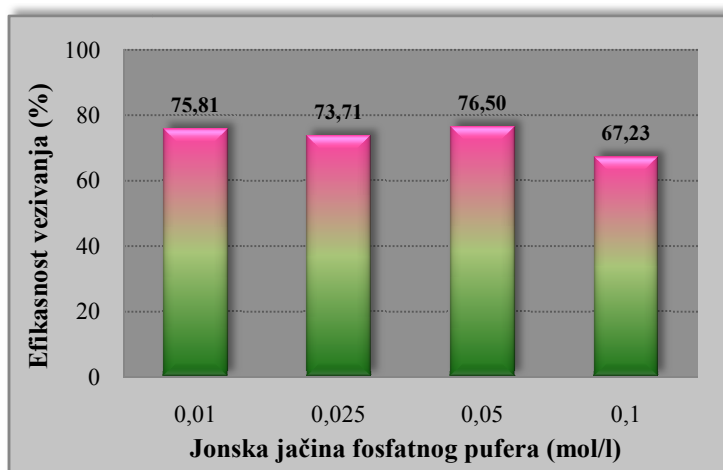
Variranjem početne koncentracije proteina u rastvorima iz kojih se izvodi njihovo vezivanje se dolazi do podatka o kapacitetu jonoizmenjivačke smole. U narednom ogledu dijalizat je razblaživan 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) tako da se dobiju rastvori različitih početnih koncentracija proteina, koji su zatim mešani sa jonoizmenjivačkom smolom u odnosu 1 : 0,5 tokom 15 minuta. Nakon isteka predviđenog vremena vezivanja, u rastvorima je određivana preostala koncentracija proteina, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 41.

Iz rezultata (Slika 41) se može primetiti da se najveća efikasnost vezivanja postiže za početnu koncentraciju proteina od 0,2476 mg/ml. Pri većim početnim koncentracijama proteina, povećava se količina vezanih proteina, koja je najveća pri početnoj koncentraciji 0,5833 mg/ml, ali je istovremeno efikasnost vezivanja znatno niža jer u rastvoru zaostaje veća količina proteina koji se nisu vezali za smolu.



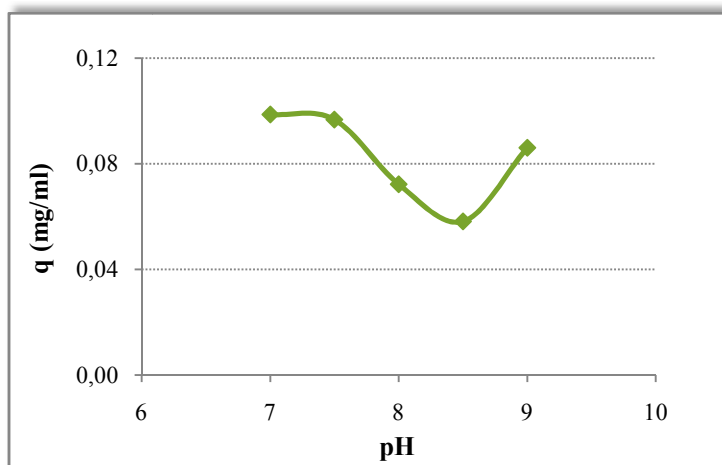
**Slika 41.** Uticaj početne koncentracije proteina u dijalizatu na efikasnost njihovog vezivanja i količinu proteina vezanih za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl

S obzirom na to da prisustvo drugih jona može imati značajan uticaj na proces vezivanja proteina za smolu, ispitan je uticaj jonske jačine fosfatnog pufera kojim se razblažuje dijalizat na efikasnost vezivanja (Slika 42). Osnovni dijalizat je razblažen fosfatnim puferom (pH 7) različitih jonskih jačina tako da je početna koncentracija proteina u dobijenim rastvorima iznosila oko 0,26 mg/ml. Sa histograma na Slici 42 se može primetiti da je efikasnost vezivanja proteina iz rastvora pripremanih razblaživanjem dijalizata fosfatnim puferom različitih jonskih jačina relativno ujednačena. Prisutni joni u datom slučaju u opsegu jonskih jačina fosfatnog pufera od 0,01 mol/l do 0,05 mol/l ne ometaju u značajnijoj meri vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu.



**Slika 42.** Uticaj jonske jačine fosfatnog pufera na efikasnost vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl

Za ispitivanje uticaja pH vrednosti na vezivanje proteina za Amberlite™ IRA 958Cl korišćen je univerzalni Britton and Robinson pufer koji pokriva pH oblast od 4,0 do 11,6 (ranijim ispitivanjima je utvrđeno da se najbolje vezivanje proteina iz pasulja postiže u intervalu pH vrednosti od 7 do 9). Dijalizat je razblaživan univerzalnim puferom odgovarajuće pH vrednosti tako da je početna koncentracija proteina u razblaženom rastvoru iznosila oko 0,21 mg/ml, a zatim je u ogledima vezivanja praćena količina vezanih proteina. Rezultati ogleda su dati na Slici 43.

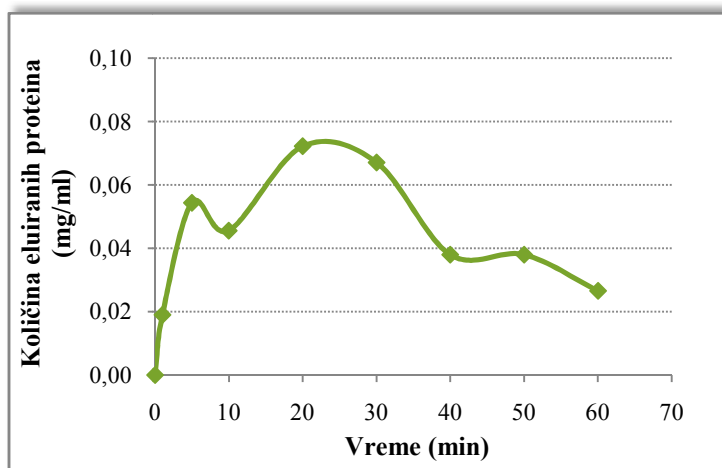


**Slika 43.** Uticaj pH vrednosti pufera na količinu proteina vezanih za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl

Sa grafika se vidi da se približno ista količina proteina iz rastvora veže pri pH 7 i 7,5, a na većim pH vrednostima količina vezanih proteina je manja za 15 do čak 49%. Za dalje ogledе kao optimalna pH vrednost pufera je usvojena pH 7, kada efikasnost vezivanja iznosi 82,54%.

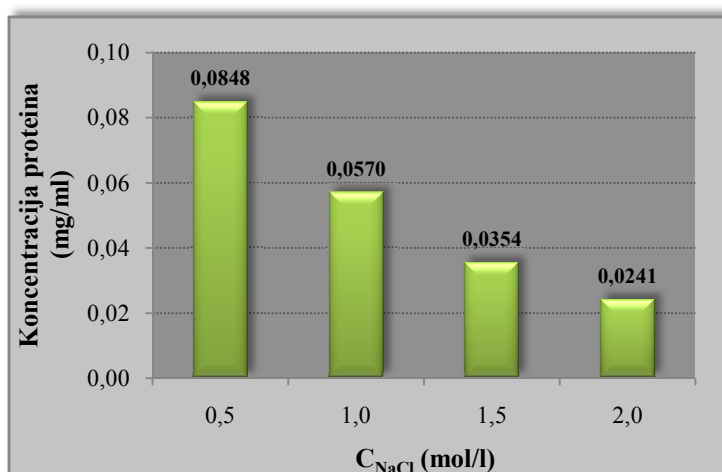
Na osnovu svih prethodno iznetih rezultata eksperimenata vezanih za utvrđivanje optimalnih uslova za vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl, usvojeni su uslovi pod kojima će se izvoditi vezivanje: dijalizat se razblažuje 0,01 mol/l fosfatnim puferom pH vrednosti 7, tako da početna koncentracija proteina u razblaženom rastvoru iznosi oko 0,26 mg/ml; razblaženi rastvor proteina se meša sa jonoizmenjivačkom smolom u zapreminskom odnosu smola : dijalizat = 1:0,5 u toku 15 minuta, pri brzini mešanja 80 o/min.

Sledeći set ogleda se odnosio na utvrđivanje optimalnih uslova za eluiranje vezanih proteina sa jonoizmenjivačke smole. U prvom koraku je izvedeno vezivanje proteina pri napred navedenim uslovima, zatim je ostatak rastvora proteina dekantovan i smola ispirana 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) u zapreminskom odnosu smola : pufer = 1:1 tokom 15 minuta, uz mešanje. Rastvor od ispiranja se odvoji i nakon toga izvodi eluiranje. U prvom ogledu, ispitana je kinetika eluiranja u vremenskom periodu od 60 minuta, pri čemu je eluiranje izvođeno sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl i zapreminskom odnosu smola : rastvor NaCl = 1:1. Na osnovu Slike 44, na kojoj je prikazana zavisnost količine eluiranih proteina od vremena eluiranja, se može zaključiti da je optimalno vreme eluiranja 20 minuta.



**Slika 44.** Zavisnost količine proteina eluiranih sa jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 958Cl od vremena eluiranja

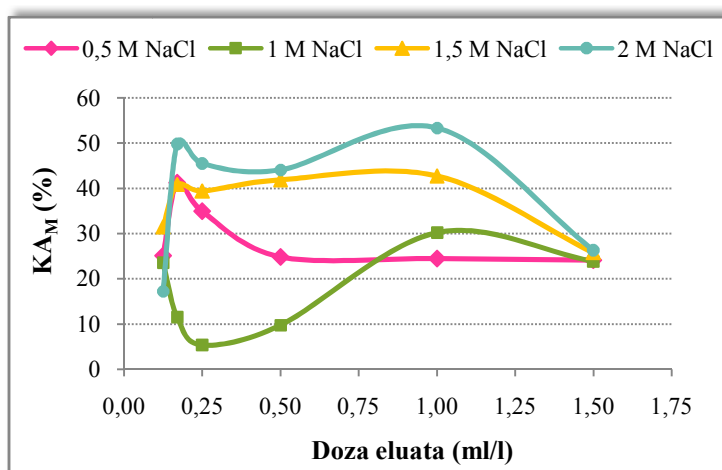
S obzirom na to da je za eluiranje proteina sa jonoizmenjivačke smole od ključne važnosti jonska jačina eluenta, u sledećem ogledu je ispitan uticaj jonske jačine rastvora NaCl na količinu eluiranih proteina. U prvom koraku, dijalizat je razblažen 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) tako da je početna koncentracija proteina u dobijenom rastvoru iznosila 0,2608 mg/ml. Iz ovog rastvora je izvedeno vezivanje proteina za smolu pri već definisanim uslovima. Količina vezanih proteina je iznosila 0,2304 mg/ml jonoizmenjivačke smole, odnosno postignuta je efikasnost vezivanja 88,35%. Nakon vezivanja, proteini su eluirani sa jonoizmenjivačke smole sukcesivnim dodavanjem rastvora NaCl rastuće koncentracije (prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1.2.), a u tako dobijenim eluatima je određena koncentracija proteina. Rezultati su dati na Slici 45.



**Slika 45.** Zavisnost količine eluiranih proteina sa jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 958Cl od koncentracije rastvora NaCl kojima je izvedeno eluiranje (u šaržnim uslovima)

Sa porastom jonske jačine rastvora NaCl, u dobijenim eluatima opada koncentracija eluiranih proteina, i najniža je u eluatu dobijenom eluiranjem sa 2 mol/l NaCl. Sabiranjem količine eluiranih proteina u sve četiri dobijene frakcije dolazi se do podatka da je u odnosu na količinu vezanih proteina efikasnost eluiranja 87,37%, odnosno da na jonoizmenjivačkoj smoli zaostaje 12,63% proteina.

Nakon eluiranja proteina, ispitana je koagulaciona aktivnost dobijenih eluata pri različitim dozama u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9. Rezultati testova koagulacije su prikazani na Slici 46. Sa grafika se vidi da najbolju koagulacionu aktivnost pokazuju proteini eluirani sa 2 mol/l rastvorom NaCl, sa maksimumom od 53,3% pri dozi eluata 1 ml/l. Ipak, samo malo niža koagulaciona aktivnost (49,8%) se postiže primenom istog eluata u oko 6 puta manjoj dozi od 0,17 ml/l.



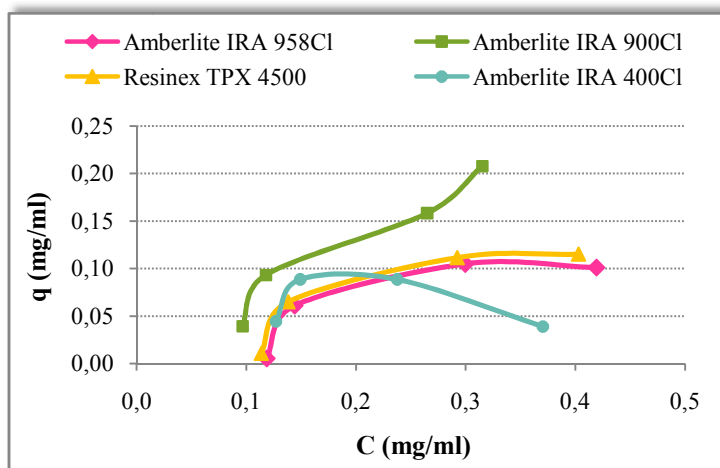
**Slika 46.** Koagulaciona aktivnost eluata (dobijenih eluiranjem sa jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 958Cl) u zavisnosti od primenjene doze

Kada se koagulaciono ponašanje eluata dobijenih prečišćavanjem proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitu Amberlite™ IRA 958Cl (Slika 46) uporedi sa ponašanjem eluata dobijenih prečišćavanjem na katjonitu Wofatit (Slika 38), može se primetiti da su, generalno posmatrano, proteinima dobijenim prečišćavanjem koagulanata iz pasulja na anjonitu potrebne dosta niže doze za postizanje slične ili veće koagulacione aktivnosti u poređenju sa proteinima dobijenim prečišćavanjem koagulanata na katjonitu. Jedino eluati dobijeni eluiranjem sa 1 mol/l NaCl pokazuju isti trend. I u jednom i u drugom slučaju maksimalnu koagulacionu aktivnost postižu eluati dobijeni eluiranjem sa 2 mol/l rastvorom NaCl, iako je koncentracija proteina u njima najniža u poređenju sa ostalim eluatima. Eluat dobijen eluiranjem sa katjonita sa 2 mol/l rastvorom NaCl maksimalnu koagulacionu aktivnost od 37,5% postiže pri dozi 2,5 ml/l, dok eluat dobijen eluiranjem sa anjonita sa rastvorom NaCl iste jonske jačine maksimalnu koagulacionu aktivnost od 53,3% postiže pri dozi 1 ml/l, a pri skoro 15 puta manjoj dozi (0,17 ml/l) još uvek veću koagulacionu aktivnost (49,8%) u poređenju sa datim eluatom dobijenim sa katjonita.

#### 4.6.3. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitima: Amberlite™ IRA 900Cl (šaržno)

U prvom koraku ispitana je i upoređen kapacitet vezivanja proteina iz sirovog ekstrakta pasulja (ekstrakt dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri ekstrakcionom odnosu 1:20) na četiri različita anjonita (od kojih je Amberlite™ IRA 958Cl već ispitana detaljnije, a rezultati su prikazani u prethodnom poglavlju, 4.6.2.): Amberlite® IRA 400Cl, Amberlite™ IRA 900Cl, Amberlite™ IRA 958Cl i Resinex™ TPX 4500, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 47. Amberlite® IRA 400Cl je jako bazni anjonit sa lako pokretnim Cl<sup>-</sup> jonom. Amberlite™ IRA 900Cl je makroretikularni jako bazni anjonit sa lako pokretnim jonom Cl<sup>-</sup>. Resinex™ TPX 4500 je makroporozni jako bazni anjonit sa lako pokretnim Cl<sup>-</sup> jonom.

Ekspiriment je izveden tako što je dijalizat dobijen po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.2. razblaživan 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) do različitih početnih koncentracija, a zatim tako dobijeni rastvori proteina mešani sa jonoizmenjivačkim smolama u zapreminskom odnosu 1:1, tokom 30 minuta. Po isteku tog vremena u rastvorima je određena preostala koncentracija proteina i izračunata količina vezanih proteina ( $q$ ) prema formuli (2).



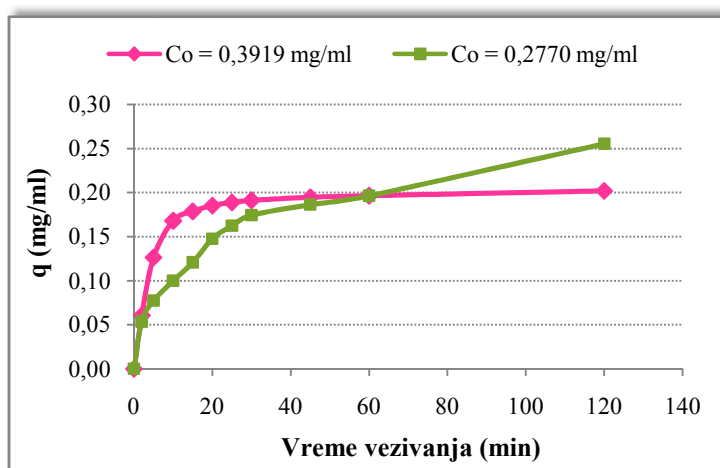
**Slika 47.** Količina proteina vezanih na različite anjonske jonoizmenjivačke smole (Amberlite<sup>®</sup> IRA 400Cl, Amberlite<sup>™</sup> IRA 900Cl, Amberlite<sup>™</sup> IRA 958Cl i Resinex<sup>™</sup> TPX 4500) u zavisnosti od ravnotežnih koncentracija proteina u rastvoru, na pH vrednosti 7

Sa dijagrama na Slici 47 se vidi da jonoizmenjivači Amberlite<sup>®</sup> IRA 400Cl, Amberlite<sup>™</sup> IRA 958Cl i Resinex<sup>™</sup> TPX 4500 imaju približno jednak maksimalni kapacitet vezivanja proteina, s tim da je Amberlite<sup>®</sup> IRA 400Cl bolja kod nižih koncentracija proteina, a značajno lošija kod većih koncentracija. Amberlite<sup>™</sup> IRA 958Cl i Resinex<sup>™</sup> TPX 4500 se ponašaju gotovo identično. Kapacitet jonoizmenjivačke smole Amberlite<sup>™</sup> IRA 900Cl je značajno veći, pa je za dalja ispitivanja prečišćavanja proteina iz semena pasulja izabran ovaj jonoizmenjivač.

Kinetika vezivanja proteina za Amberlite<sup>™</sup> IRA 900Cl je praćena preko količine vezanih proteina u toku 2 sata, iz dva rastvora različitih početnih koncentracija proteina. Praćenjem kinetike vezivanja se dolazi do podataka o potrebnom (optimalnom) vremenu vezivanja proteina za smolu. Rezultati praćenja kinetike vezivanja proteina za ovu jonoizmenjivačku smolu su prikazani na Slici 48.

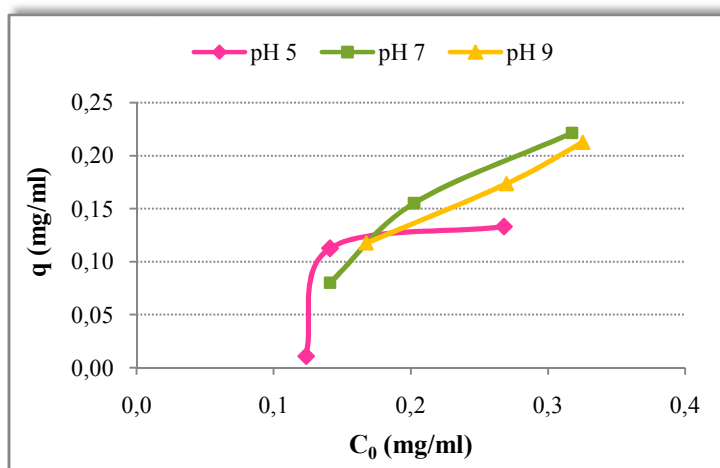
Sa dijagrama se uočava da pri većoj početnoj koncentraciji proteina, nakon 30-og minuta kontakta smole i rastvora ne dolazi do značajnijih promena u pogledu količine vezanih proteina. U slučaju kada je početna količina proteina u rastvoru u kome se izvodi vezivanje niža, do 30-og minuta količina vezanih proteina raste dosta brzo, a od 30-og do 120-og minuta nešto sporije. Nakon 2 sata, koliko je trajao eksperiment, u rastvoru čija je početna koncentracija proteina iznosila 0,2770 mg/ml se postiže efikasnost vezivanja 91,84%. Ipak, s obzirom na to da je vreme vezivanja od 2 sata dosta dugo, a da se za vreme od 30 minuta veže najveća količina proteina, ovo vreme je izabrano kao vreme kontakta jonoizmenjivačke smole Amberlite<sup>™</sup> IRA 900Cl i rastvora proteina. Kada se uporedi kinetika vezivanja proteina na ovom jonoizmenjivaču sa kinetikom vezivanja za Amberlite<sup>™</sup> IRA 958Cl (Slika 39), vidi se da je vezivanje za Amberlite<sup>™</sup> IRA 900Cl dosta stabilnije. Efikasnost vezivanja je slična kod obe jonoizmenjivačke smole pri većoj početnoj koncentraciji proteina u rastvoru, i kreće se oko 50%, dok se pri manjoj početnoj koncentraciji proteina na Amberlite<sup>™</sup> IRA 900Cl postiže značajno veća efikasnost vezivanja, ali je i vreme vezivanja pri kome se postiže takva

efikasnost znatno duže. Vezivanje proteina semena pasulja za Amberlite™ IRA 900Cl je takođe značajno stabilnije u poređenju sa vezivanjem proteina iz pasulja za katjonit Wofatit (Slika 36).



**Slika 48.** Zavisnost količine proteina vezanih za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl od vremena kontakta smole i rastvora proteina pri različitim početnim koncentracijama proteina u rastvoru

Iz ogleada u kome je određivana količina proteina vezanih na jonizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl na različitim pH vrednostima (Slika 49) dobijaju se podaci o uticaju pH vrednosti pufera koji se koristi za razblaživanje osnovnog dijalizata (kako bi se postigle različite početne koncentracije proteina u rastvoru) na proces vezivanja. Uticaj pH vrednosti na vezivanje proteina je ispitan na tri pH vrednosti: 5, 7 i 9, praćenjem količine proteina vezanih za smolu.



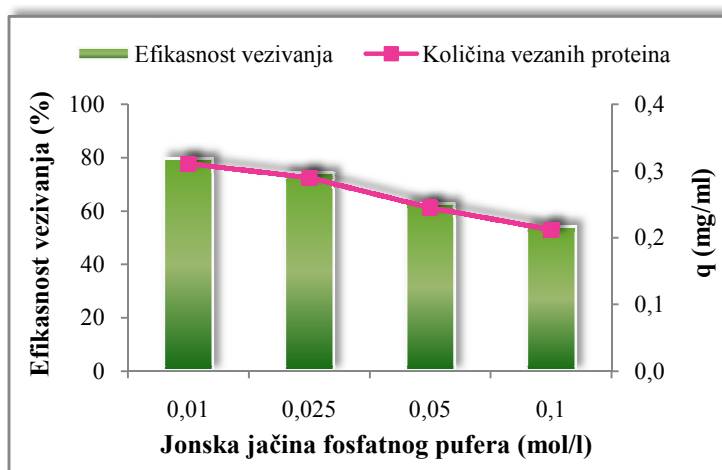
**Slika 49.** Količina proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl na različitim pH vrednostima u zavisnosti od početne koncentracije proteina u rastvoru

Sa grafika se vidi da pH 5 ne pogoduje vezivanju (što je bilo i očekivano s obzirom da je ova pH vrednost bliska izoelektričnoj tački dijalizata, koja se kreće između pH 4 i 5,5 (Antov et al., 2010)), dok se na pH 7 i pH 9 vezivanje odvija na sličan način. Na pH vrednosti 7 se vezuje nešto veća količina proteina nego na pH 9, a s obzirom na to da je sa ekonomske tačke gledišta i sa tačke uticaja na životnu sredinu uvek povoljnije raditi na neutralnom pH (ukoliko je to moguće) nego pri baznom, pH 7 je izabran za dalje oglede. Kada se pogledaju rezultati za uticaj pH vrednosti na vezivanje proteina iz pasulja za Amberlite™ IRA 958Cl



(Slika 43), vidi se da su i za tu jonoizmenjivačku smolu povoljne pH vrednosti za vezivanje proteina iz pasulja bile pH 7 i 9, a pH 7 je i u tom slučaju izabran za dalja ispitivanja kao ekonomski i ekološki pogodniji. Za razliku od vezivanja proteina iz pasulja na anjonit Amberlite™ IRA 900Cl (Slika 49), vezivanje na katjonit Wofatit je bilo slično na pH 5 i 7 (Slika 35).

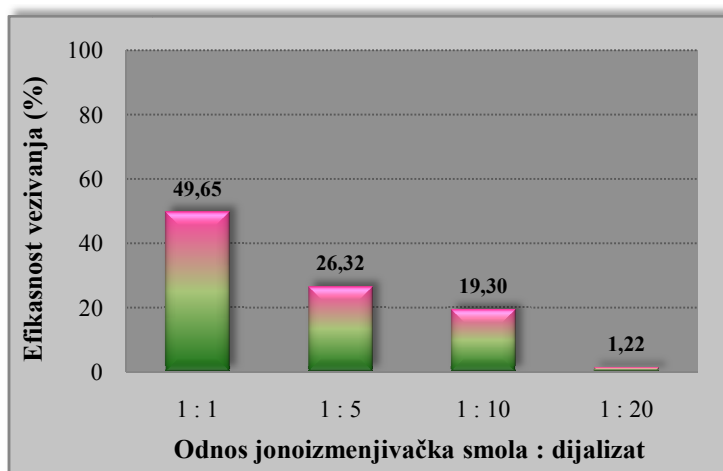
Pored određivanja optimalne pH vrednosti pufera za vezivanje proteina, potrebno je odrediti i njegovu optimalnu jonsku jačinu, pa su na Slici 50 prikazani rezultati uticaja jonske jačine fosfatnog pufera na procenat proteina vezanih za jonoizmenjivačku smolu. Sa porastom jonske jačine fosfatnog pufera kojim se razblažuje dijalizat, kapacitet jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 900Cl opada, a s obzirom na to da je u datom ogledu početna koncentracija proteina u svim slučajevima bila ista (0,39 mg/ml), sa opadanjem količine vezanih proteina, opada i efikasnost vezivanja, što je različito u odnosu na vezivanje proteina iz pasulja za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 958Cl (Slika 42), kod koje jonska jačina fosfatnog pufera nije toliko uticala na vezivanje, kao u ovom slučaju. Smanjenje efikasnosti vezivanja proteina sa porastom jonske jačine fosfatnog pufera se može objasniti time da drugi joni prisutni u većoj količini ometaju u izvesnoj meri proces vezivanja proteina tako što se takmiče sa njima za adsorpciona mesta. Ipak, pri povećanju koncentracije fosfatnog pufera za 10 puta, kapacitet jonoizmenjivača Amberlite™ IRA 900Cl se smanjuje samo za oko 30%. S obzirom na ovakav trend zavisnosti efikasnosti vezivanja proteina od koncentracije fosfatnog pufera, za dalja ispitivanja je izabran fosfatni pufer koncentracije 0,01 mol/l.



**Slika 50.** Količina proteina vezanih na jonoizmenjivačku smole Amberlite™ IRA 900Cl i efikasnost vezivanja pri različitim jonskim jačinama fosfatnog pufera korišćenog za razblaživanje osnovnog dijalizata

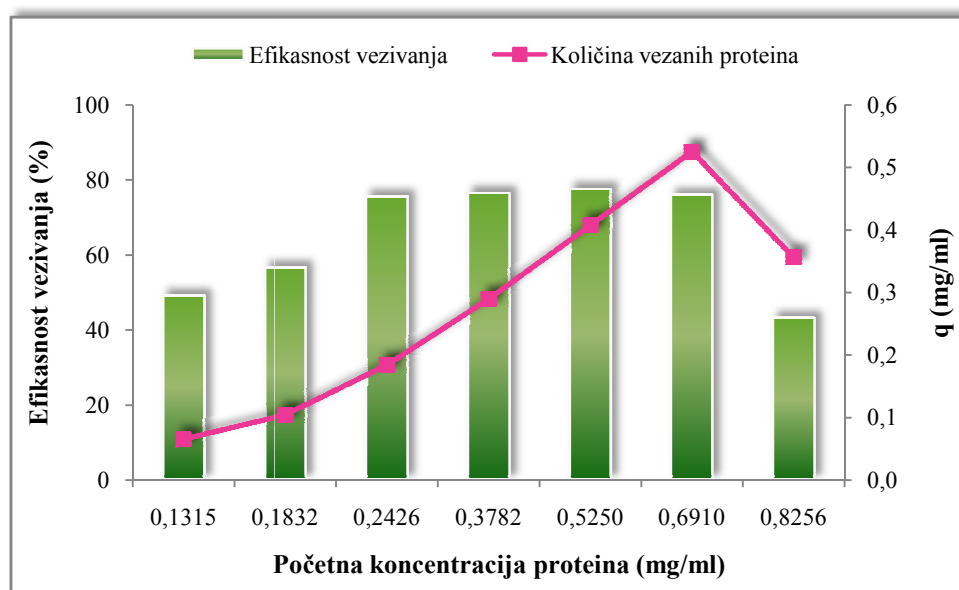
Nakon određivanja optimalnog pH i koncentracije pufera, određen je optimalan zapreminski odnos mešanja jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 900Cl i dijalizata. Praćena je efikasnost vezivanja proteina iz rastvora (u kojima je početna koncentracija proteina bila približno 0,4 mg/ml) pri različitim odnosima mešanja smole i dijalizata, pri čemu je zapremina jonoizmenjivačke smole bila konstantna, a varirana je zapremina dijalizata. Dobijeni rezultati su prikazani histogramom na Slici 51.

Sa histograma (Slika 51) se vidi da povećanje zapremine rastvora proteina u odnosu na zapreminu jonoizmenjivačke smole dovodi do smanjenja količine vezanih proteina, odnosno do smanjenja efikasnosti vezivanja, što se može pripisati posrednom smanjenju broja aktivnih mesta za adsorpciju proteina u odnosu na njihovu količinu. Za dalji rad je izabran zapreminski odnos mešanja jonoizmenjivačke smole i dijalizata 1:1.



**Slika 51.** Zavisnost efikasnosti vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl od zapreminskog odnosa mešanja smole i dijalizata

Pošto su određeni parametri vezani za pufer, kao i odnos mešanja smole i dijalizata, a pre nego se izvede vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu, potrebno je odrediti njen kapacitet. Rezultati određivanja kapaciteta jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 900Cl su dati na Slici 52.

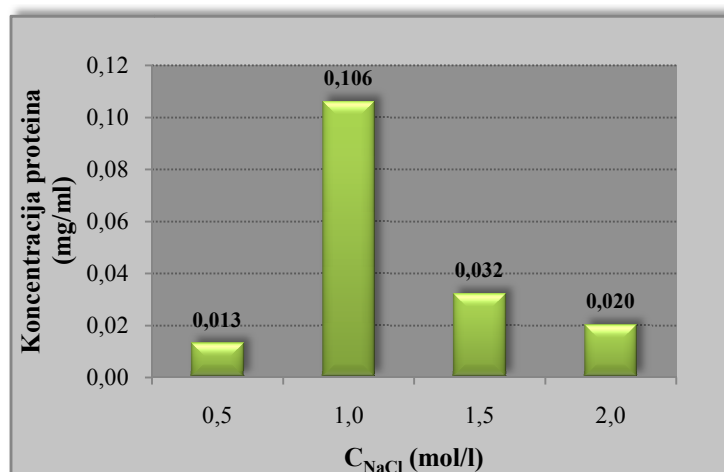


**Slika 52.** Zavisnost efikasnosti vezivanja i količine proteina vezanih za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl od početne koncentracije proteina u rastvoru

Na osnovu analize rezultata prikazanih na Slici 52 može se zaključiti da ispitivani jonoizmenjivač pri datim uslovima vezivanja (početna koncentracija proteina 0,691 mg/ml, vreme vezivanja 30 minuta, pH i koncentracija fosfatnog pufera 7 i 0,01 mol/l, respektivno, zapreminski odnos jonoizmenjivačke smole i rastvora proteina 1:1, brzina mešanja oko 80 o/min) može da veže maksimalno 0,5245 mg proteina po 1 ml smole. Takođe, u tom slučaju se postiže približno maksimalna efikasnost vezivanja, 75,9%. Pri povećanju početne koncentracije proteina iznad 0,691 mg/ml u rastvoru iz koga se izvodi vezivanje, količina vezanih proteina opada, kao i efikasnost vezivanja. Sa grafika se takođe može uočiti da ni pri najnižim početnim koncentracijama proteina neće biti vezani svi proteini, iako kapacitet same smole to dozvoljava, što je posledica ravnoteže koja se uspostavlja u sistemu između količine

vezanih proteina i količine onih koji preostaju u rastvoru. Prilikom ispitivanja kinetike vezivanja proteina dijalizata (koji je dobijen na isti način iz ekstrakta pasulja) za istu jonoizmenjivačku smolu u okviru drugog rada, Antov i saradnici (2010) su opisujući adsorpciju Langmuir-ovom adsorpcionom izotermom, došli do istog podatka za kapacitet jonoizmenjivača, odnosno prema podacima iznetim od strane ovih autora, maksimalni kapacitet jonoizmenjivača je 0,51 mg/ml jonoizmenjivačke smole. Autori takode navode da je ovaj kapacitet znatno niži od onog određenog za proteine iz *M. oleifera*-e (Ghebremichael et al., 2006), što objašnjavaju činjenicom da je procenjena molekulska masa dimernog proteina *M. oleifera*-e 13 kDa, a prema literaturnim podacima podjedinica fazeolina, glavnog proteina pasulja koji je trimer, ima molekulska masu oko 50 kDa (Montoya et al., 2008), pa se on može vezivati samo na površini zrnaca jonoizmenjivača. Poređenjem rezultata prikazanih na Slici 52 i Slici 41 dolazi se do zaključka da se na smoli Amberlite™ IRA 900Cl pri istoj početnoj koncentraciji proteina (oko 0,6 mg/ml, kada se vezuje maksimalna količina proteina i na jednoj i na drugoj jonoizmenjivačkoj smoli) može vezati oko 2 puta veća količina proteina nego na jonoizmenjivačkoj smoli Amberlite™ IRA 958Cl. Takođe, rezultati prikazani na Slikama 35, 41, 47 i 52 govore u prilog činjenici da od svih ispitivanih jonoizmenjivačkih smola (Wofatit, Amberlite™ IR 120Na, Resinex TPX 4500, Amberlite™ IRA 400Cl, Amberlite™ IRA 958Cl i Amberlite™ IRA 900Cl), jonoizmenjivačka smola Amberlite™ IRA 900Cl ima najveći kapacitet za vezivanje proteina iz ekstrakta pasulja.

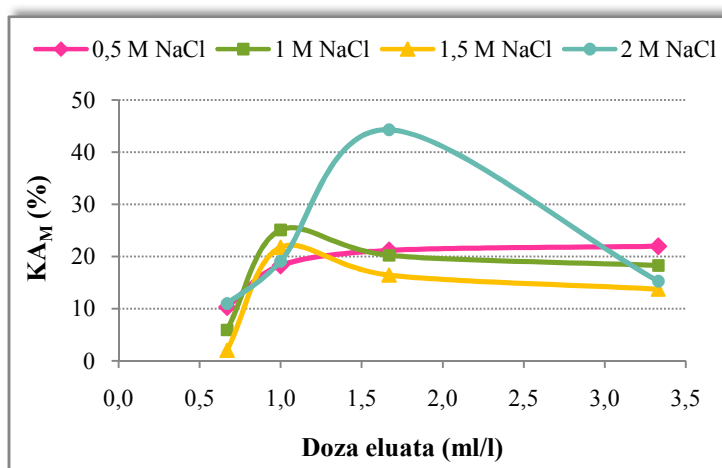
Kada su određeni optimalni uslovi za vezivanje proteina iz ekstrakta pasulja na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl, izvedeno je vezivanje proteina za smolu iz rastvora u kome je njihova početna koncentracija podešena na 0,4230 mg/ml razblaživanjem dijalizata sa 0,01 mol/l fosfatnim puferom pH 7, a nakon vezivanja proteina, smola je isprana puferom. Sledeći korak po ispiranju smole je bio eluiranje vezanih proteina, što je izvedeno sukcesivno rastvorima NaCl rastuće koncentracije. U dobijenim eluatima je određen sadržaj proteina, što je prikazano na Slici 53.



**Slika 53.** Koncentracija proteina u eluatima dobijenim eluiranjem sa jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 900Cl (u šaržnim uslovima) rastvorima NaCl koncentracije: 0,5 mol/l, 1 mol/l, 1,5 mol/l i 2 mol/l

Za razliku od jonoizmenjivačkih smola Wofatit (Slika 37) i Amberlite™ IRA 958Cl (Slika 45), kod kojih se najveća količina proteina eluirala 0,5 mol/l rastvorom NaCl, a zatim je sa porastom koncentracije rastvora NaCl (eluenta) opadala, u slučaju jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 900Cl (Slika 53) situacija je drugačija – eluat dobijen eluiranjem sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl je imao najmanju koncentraciju proteina. Najveća količina proteina se eluira sa ove jonoizmenjivačke smole primenom 1 mol/l rastvora NaCl.

Dobijeni eluati su korišćeni kao koagulanti u testovima koagulacije. Testovi su izvedeni u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9. Zavisnost koagulacione aktivnosti eluata od primenjene doze je prikazana na Slici 54.

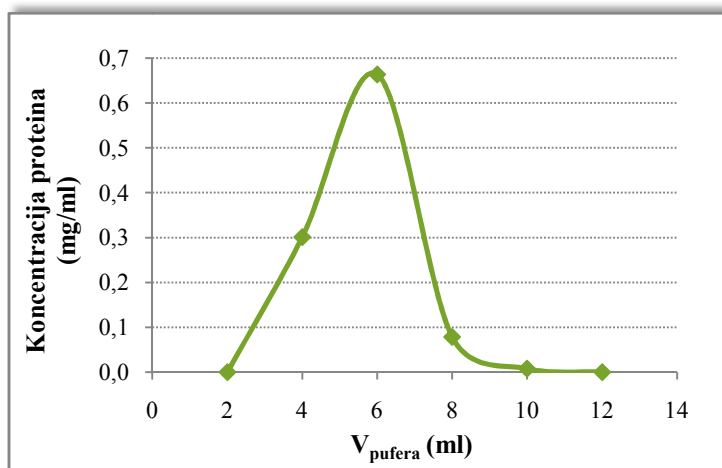


**Slika 54.** Koagulaciona aktivnost eluata (dobijenih eluiranjem sa jonoizmenjivačke smole Amberlite™ IRA 900Cl 0,5 mol/l, 1 mol/l, 1,5 mol/l i 2 mol/l rastvorom NaCl) pri različitim primenjenim dozama

Kod svih ispitivanih eluata najmanja doza (0,67 ml/l) nije bila dovoljna, jer su pri ovoj dozi svi eluati imali najnižu koagulacionu aktivnost, oko ili ispod 10%. Kod eluata dobijenog sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl sa povećanjem doze se blago povećava i koagulaciona aktivnost, ali generalno ostaje niska pri svim ispitivanim dozama – oko 20%. Eluati dobijeni sa 1 mol/l i 1,5 mol/l rastvorom NaCl pokazuju slično koagulaciono ponašanje, i postižu maksimalnu koagulacionu aktivnost pri istoj dozi – 1 ml/l. Ipak, i ova dva eluata imaju prilično nisku koagulacionu aktivnost sa maksimumom oko 25%. Najbolju koagulacionu aktivnost je pokazao eluat dobijen eluiranjem sa 2 mol/l rastvorom NaCl, što je bio slučaj i kod prečišćavanja proteina na jonoizmenjivaču Amberlite™ IRA 958Cl. Oko 2 puta veću (44,3%) koagulacionu aktivnost od ostalih je ovaj eluat postigao pri dozi 1,67 ml/l. I u slučaju ispitivanog katjonita (Wofatit), eluat dobijen eluiranjem sa 2 mol/l rastvorom NaCl je postigao najveću koagulacionu aktivnost (nešto nižu od 40%), pri dozi 2,5 ml/l.

Kako bi se preciznije odredile koncentracije rastvora NaCl kojima će biti izvedeno eluiranje proteina sa jonoizmenjivačke smole u šaržnim uslovima, u sledećim eksperimentima je prvo izvedeno vezivanje proteina za jonoizmenjivač u koloni, a zatim i njihovo eluiranje u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl, na osnovu čega je dobijen elucioni dijagram. Elucioni dijagram je poslužio kao osnova za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se izvesti sukcesivno eluiranje nakon vezivanja proteina u šaržnim uslovima rada.

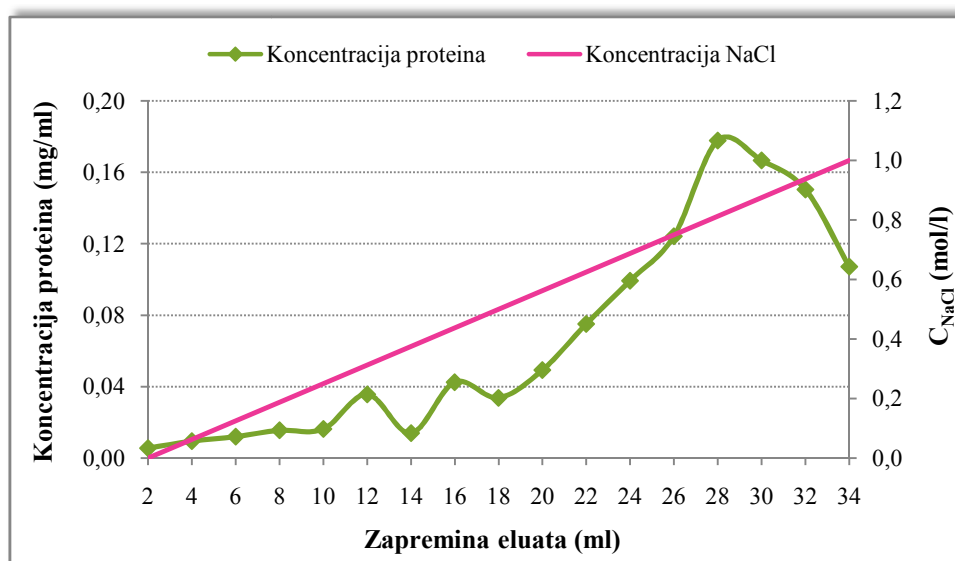
U prvom eksperimentu, na jonoizmenjivačku smolu je nanet 1 ml dijalizata, koji je sadržao 6,8535 mg/ml proteina. Deo proteina se vezao za smolu, a proteini koji se nisu vezali su ispirani 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7), kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.3. Na izlazu iz kolone su sakupljane frakcije zapremine 2 ml, u kojima je određivana količina proteina, i kada u poslednjoj frakciji više nije bilo proteina koji se ispiraju sa smole, proces vezivanja je završen. Rezultati određivanja sadržaja proteina u frakcijama dobijenim ispiranjem fosfatnim puferom u zavisnosti od zapremine pufera koji je protekao kroz kolonu, su prikazani na grafiku (Slika 55).



**Slika 55.** Koncentracija proteina u frakcijama dobijenim ispiranjem proteina koji se nisu vezali za jonizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl fosfatnim puferom u zavisnosti od zapremine pufera koji je protekao kroz kolonu

Sa Slike 55 se uočava da se jedan deo proteina unetih u kolonu ne vezuje za jonoizmenjivačku smolu, što se može objasniti sa više uzroka: kapacitet jonizmenjivača dozvoljava vezivanje proteina do određene količine, vreme kontakta smole i proteina može biti previše kratko da bi svi proteini doprli do aktivnih centara na smoli, deo proteina u dijalizatu ima pozitivno naelektrisanje i oni se ne mogu vezati za jonoizmenjivač (anjonit). Količina proteina koji se nisu vezali za jonoizmenjivačku smolu iznosi 2,0519 mg, odnosno procenat proteina koji su se vezali za smolu je 70,1% od ukupne unete količine. Dakle, u ovom postupku se za smolu vezalo 0,5335 mg proteina/ml smole, što odgovara ranije određenom kapacitetu ove jonoizmenjivačke smole.

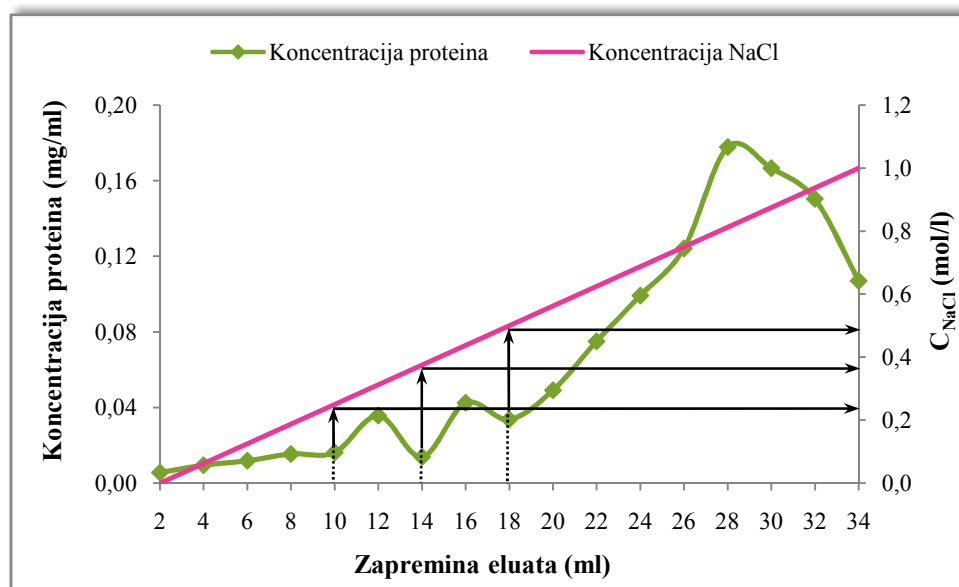
Nakon faze vezivanja proteina za smolu u koloni, izvedeno je njihovo kontinualno eluiranje u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl koja raste od 0 mol/l – 1 mol/l (opis postupka je dat u poglavlju 3.2.1.3.). Na izlazu iz kolone su sakupljane frakcije od po 2 ml u kojima je određena koncentracija proteina i na osnovu tih podataka je konstruisan elucioni dijagram prikazan na Slici 56.



**Slika 56.** Koncentracija proteina u frakcijama sakupljenim tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1 mol/l

Na elucionom dijagramu se uočavaju 3 proteinska pika, čiji su maksimumi u frakcijama 6, 8 i 14. Sabiranjem količine proteina eluiranih u svih 17 frakcija, dolazi se do podatka da je ukupno eluirano 2,2180 mg proteina, odnosno 46,19% u odnosu na količinu vezanih proteina, pa sledi da pri ovakvim uslovima eluiranja na smoli zaostaje vezano 53,81% proteina.

Na osnovu pikova proteina na elucionom dijagramu (Slika 56) se, prema šemi datoj na Slici 57, određuje kojim koncentracijama rastvora NaCl će se izvesti stupnjevito eluiranje u sledećem, šaržnom ogledu, kako bi se u frakcijama izdvojili upravo ti proteini koji su na elucionom dijagramu dali pikove.



**Slika 57.** Šema za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se eluirati odgovarajući pikovi proteina tokom šaržnog postupka vezivanja i eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl

U sledećem ogledu, dijalizat je razblažen 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) do početne koncentracije proteina u rastvoru 0,2753 mg/ml. Ovaj rastvor je mešan sa jonoizmenjivačkom smolom Amberlite™ IRA 900Cl u zapreminskom odnosu 1:1, 30 minuta. Nakon vezivanja, u rastvoru preostaje 0,0197 mg/ml proteina, što znači da je vezano 92,86%, odnosno 0,2556 mg proteina/ml smole.

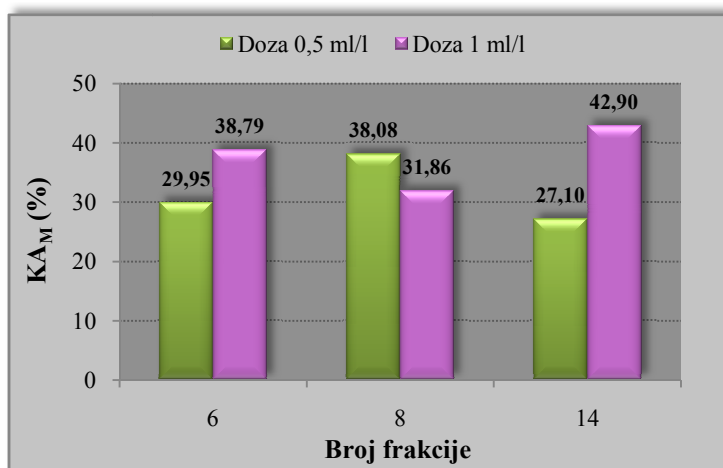
Posle ispiranja smole 0,01 mol/l fosfatnim puferom (pH 7) u zapreminskom odnosu 1:1 tokom 15 minuta, izvodi se eluiranje. Sa šeme na Slici 57 je određeno da se eluiranje izvodi sledećim rastvorima NaCl u 0,01 mol/l fosfatnom puferu (pH 7): 0,25 mol/l, 0,38 mol/l, 0,5 mol/l i 1 mol/l. Zapreminski odnos mešanja smole i eluenta je iznosio 1:1, vreme eluiranja 15 minuta. Rezultati određivanja koncentracije proteina u frakcijama su prikazani u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Koncentracija proteina u frakcijama dobijenim eluiranjem sa 0,25 mol/l, 0,38 mol/l, 0,50 mol/l i 1,00 mol/l rastvorom NaCl, u šaržnim uslovima

Frakcija:	Eluiranje proteina rastvorima NaCl (mol/l):	Koncentracija proteina u frakcijama (mg/ml):
I	0,25	0,0067
II	0,38	0,0208
III	0,50	0,0350
IV	1,00	0,0514

Do podatka o ukupnoj eluiranoj količini proteina se dolazi sabiranjem količina proteina u sve četiri frakcije. Nakon eluiranja, 55,44% proteina ostaje vezano za jonoizmenjivačku smolu, odnosno efikasnost eluiranja je 44,56%, slično kao pri eluiranju u koloni.

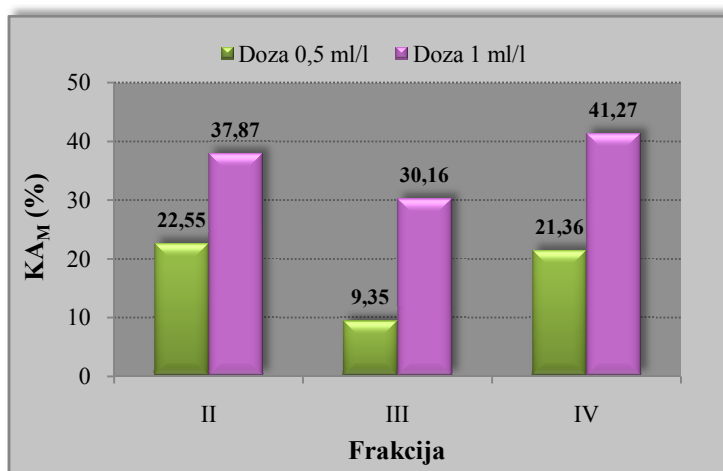
Za frakcije 6, 8 i 14 iz kolonske hromatografije, i II, III i IV iz šaržne hromatografije su određene koagulacione aktivnosti testovima koagulacije u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9. U testovima su primenjene dve doze: 0,5 ml/l i 1 ml/l. Rezultati za frakcije dobijene kolonskom hromatografijom su prikazani na Slici 58, a za one dobijene šaržnom hromatografijom na Slici 59.



**Slika 58.** Koagulacione aktivnosti frakcija (pri dozama 0,5 ml/l i 1 ml/l) dobijenih kolonskom hromatografijom na Amberlite™ IRA 900Cl pri kontinualnom eluiranju u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1 mol/l

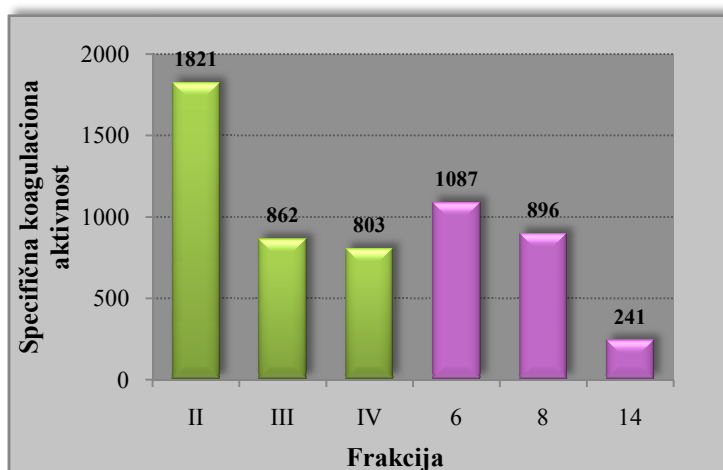
Sa grafika na Slici 58 se vidi da frakcije 6 i 14 imaju bolju koagulacionu aktivnost pri većoj ispitivanoj dozi (1 ml/l), a frakcija 8 pri manjoj (0,5 ml/l). Frakcija 8 ima skoro jednaku koagulacionu aktivnost pri duplo manjoj dozi kao frakcija 6 pri dozi 1 ml/l, a sadržaj proteina u njima je približno isti. Najveću koagulacionu aktivnost (42,9%) ima frakcija 14, koja ima i najveći sadržaj proteina. Međutim sadržaj proteina u 14-oj frakciji je oko 4 puta veći od sadržaja proteina u 6-oj i 8-oj frakciji, dok je njena koagulaciona aktivnost veća samo za 4%, i pri tome, ako se poredi sa 8-om frakcijom, pri duplo većoj dozi.

Kod eluiranja izvedenog rastvorima NaCl koncentracije kao što je navedeno u Tabeli 10 (šaržna hromatografija), sve dobijene frakcije pokazuju značajno bolju koagulacionu aktivnost pri većoj primenjenoj dozi (Slika 59). Kao i u prethodnom slučaju, najveću koagulacionu aktivnost postigla je frakcija koja ima najveći sadržaj proteina (IV frakcija), ali i ovde je uočljivo da je sadržaj proteina u toj frakciji oko 2,5 puta veći od sadržaja u II frakciji, dok je koagulaciona aktivnost veća samo za oko 4%. U poređenju sa frakcijama koje su dobijene eluiranjem sa 0,5 mol/l, 1 mol/l, 1,5 mol/l i 2 mol/l rastvorima NaCl (Slika 54), frakcije dobijene na ovaj način su pokazale bolju koagulacionu aktivnost.



**Slika 59.** Koagulacione aktivnosti frakcija (pri dozama 0,5 ml/l i 1 ml/l) dobijenih šaržnom hromatografijom na Amberlite™ IRA 900Cl pri stupnjevitom eluiranju rastvorom NaCl

Odnos koagulacione aktivnosti i sadržaja proteina u datim frakcijama se može bolje sagledati ukoliko se koagulaciona aktivnost prikaže kao specifična aktivnost za svaku od frakcija (Slika 60). Specifična aktivnost (izračunata za bolju koagulacionu aktivnost) je najveća u II frakciji dobijenoj šaržnom hromatografijom, u kojoj je količina proteina najmanja.



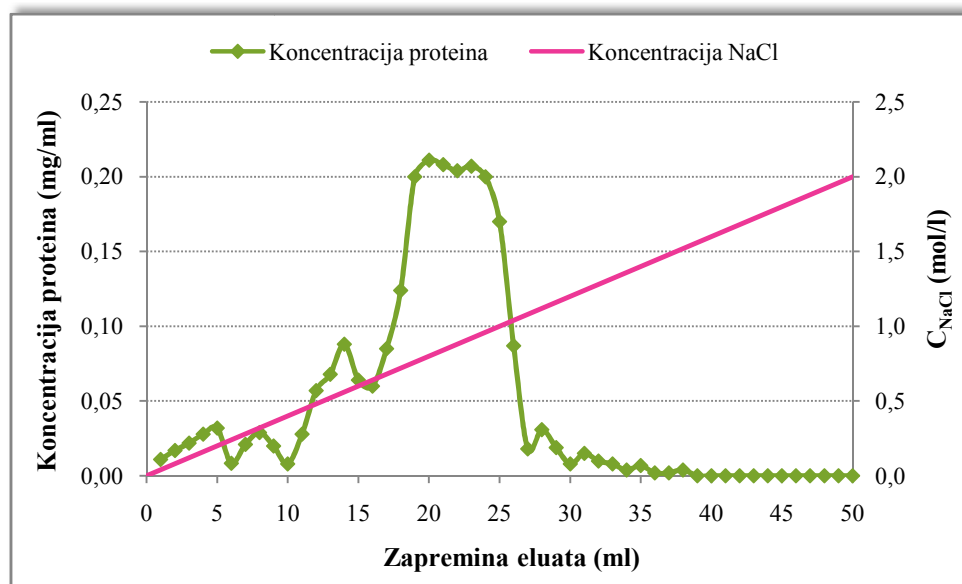
**Slika 60.** Specifične koagulacione aktivnosti frakcija proteina dobijenih šaržnom (II, III i IV) i kolonskom (6, 8 i 14) hromatografijom na Amberlite™ IRA 900Cl

#### 4.6.4. Prečišćavanje proteina iz ekstrakta pasulja na anjonitima: Amberlite™ IRA 900Cl (kolonska hromatografija)

Nakon prečišćavanja proteina na jonoizmenjivaču Amberlite™ IRA 900Cl u šaržnim uslovima, izvedeno je i njihovo prečišćavanje na istom jonoizmenjivaču u koloni, pri čemu je eluiranje vezanih proteina izvođeno u dva režima rada: kontinualno i diskontinualno. Takođe, s obzirom na rezultate prikazane u radu Antov i saradnika (2010), za adsorpciju proteina je izabran 0,05 mol/l fosfatni pufer (pH 7,5).



U prvom eksperimentu u ovoj grupi oglada, nakon vezivanja proteina za jonoizmenjivačku smolu (pri čemu je na nju nanešen 1 ml dijalizata u kome je koncentracija proteina iznosila 4,5330 mg/ml) po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.4., oni su eluirani protokom od 1 ml/min u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 – 2 mol/l. Na izlazu iz kolone sakupljane su frakcije od po 1 ml, a u njima je određena koncentracija proteina. Dobijeni rezultati su prikazani elucionim dijagramom na Slici 61.

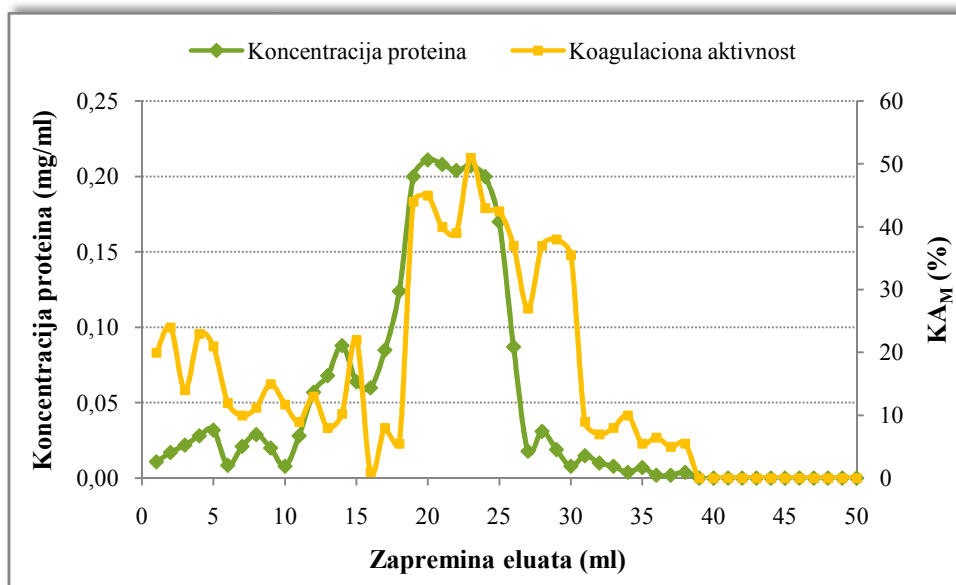


**Slika 61.** Koncentracija proteina u frakcijama sakupljenim tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 2 mol/l

Sa elucionog dijagrama se vidi da se maksimalne koncentracije proteina nalaze u frakcijama od 19-te do 24-te, i iznose oko 0,2 mg/ml, dok se od 16-te do 27-e frakcije formira veliki proteinski pik. Ovaj pik se nalazi u oblasti koncentracija rastvora NaCl kojim je izvedeno eluiranje od 0,64 mol/l do 1,08 mol/l. Ukupna količina proteina eluiranih u svim frakcijama je 2,3855 mg, što čini 52,63% od količine proteina unete u kolonu, i ovo je nešto malo bolja efikasnost eluiranja u poređenju sa eluiranjem sa iste jonoizmenjivačke smole u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1 mol/l.

Dobijenim frakcijama je određena koagulaciona aktivnost u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9, pri dozi frakcija od 1 ml/l, a kako bi se utvrdilo da li postoji povezanost između koncentracije proteina u frakcijama i koagulacione aktivnosti, na sledećem grafiku (Slika 62) je dat paralelni prikaz koagulacione aktivnosti i koncentracije proteina u frakcijama.

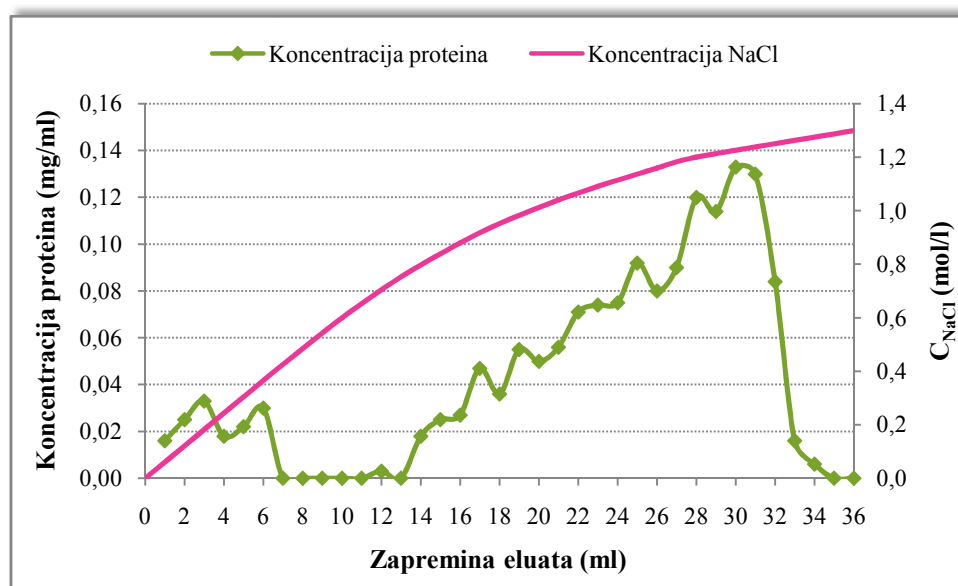
Sa grafika na Slici 62 se uočava da je koagulaciona aktivnost najveća u frakcijama od 19-te do 30-te, što se delimično poklapa sa velikim proteinskim pikom. Sa grafika je takođe uočljivo da u ovom gradijentu koncentracije rastvora NaCl nije postignuto u potpunosti dobro razdvajanje proteina, pa je u sledećem ogledu eluiranje proteina sa jonoizmenjivačke smole izvedeno u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl.



**Slika 62.** Koncentracija proteina i koagulaciona aktivnost frakcija sakupljenih tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 2 mol/l

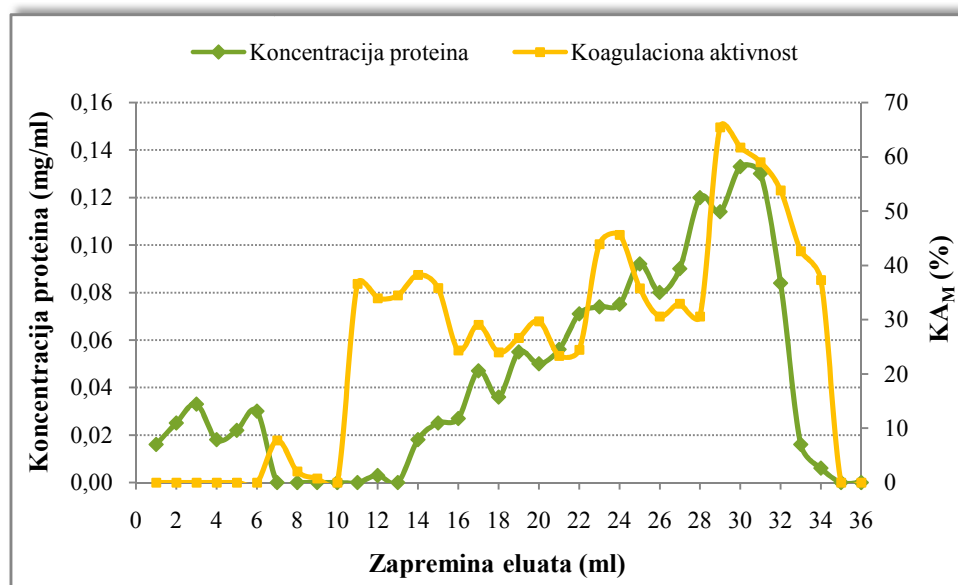
Na jonoizmenjivačku smolu je nanoseno 0,35 ml dijalizata u kome je koncentracija proteina iznosila 5,7199 mg/ml, i vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu je izvedeno kao u prethodnom ogledu, a zatim je eluiranje izvedeno u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl. S obzirom na to da frakcije od 35-te do 50-te, dobijene eluiranjem u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 2 mol/l NaCl, nisu sadržale proteine ili je njihova količina bila neznatna (Slika 61), kao i to da su one imale neznatnu ili nikakvu koagulacionu aktivnost (Slika 62), u ovom eksperimentu se eksponencijalni gradijent koncentracije rastvora NaCl kretao od 0 mol/l – 1,3 mol/l. Koncentracija rastvora NaCl od 1,3 mol/l je izabrana kao završna koncentracija eluenta tokom eluiranja jer je to koncentracija nakon koje su eluirani sadržaj proteina i njihova koagulaciona aktivnost tokom eluiranja u linearnom gradijentu bili zanemarljivi. Uvođenjem eluiranja u eksponencijalnom gradijentu koncentracije eluenta se postiže da se u području eluiranja gde se javlja veća koncentracija proteina i gde se očekuje više proteinskih pikova, koncentracija eluenta menja sporije sa vremenom u odnosu na linearni gradijent, pa se samim tim očekuje da se postigne bolje razdvajanje pikova, odnosno proteina. U ovom ogledu eluiranje je izvedeno u toku 36 minuta, za koje vreme je sakupljeno 36 frakcija zapremine 1 ml. U frakcijama je određena koncentracija proteina, što je prikazano na Slici 63.

Kada se uporedi ovaj elucioni dijagram sa onim dobijenim eluiranjem u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 2 mol/l (Slika 61), primećuje se da je prelaskom na eksponencijalni gradijent postignuto nešto bolje razdvajanje proteina. Najveći sadržaj proteina se dobija u 30-oj frakciji, a generalno visoke koncentracije proteina se nalaze u frakcijama od 16-e do 32-e, gde one daju nekoliko nedovoljno dobro definisanih proteinskih pikova.



**Slika 63.** Koncentracija proteina u frakcijama sakupljenim tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 36 minuta

Sa dobijenim frakcijama su izvedeni testovi koagulacije u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9, sa dozom frakcija od 1 ml/l, i na dijagramu na Slici 64 su uporedo prikazane koncentracije proteina u datim frakcijama i njihova koagulaciona aktivnost.

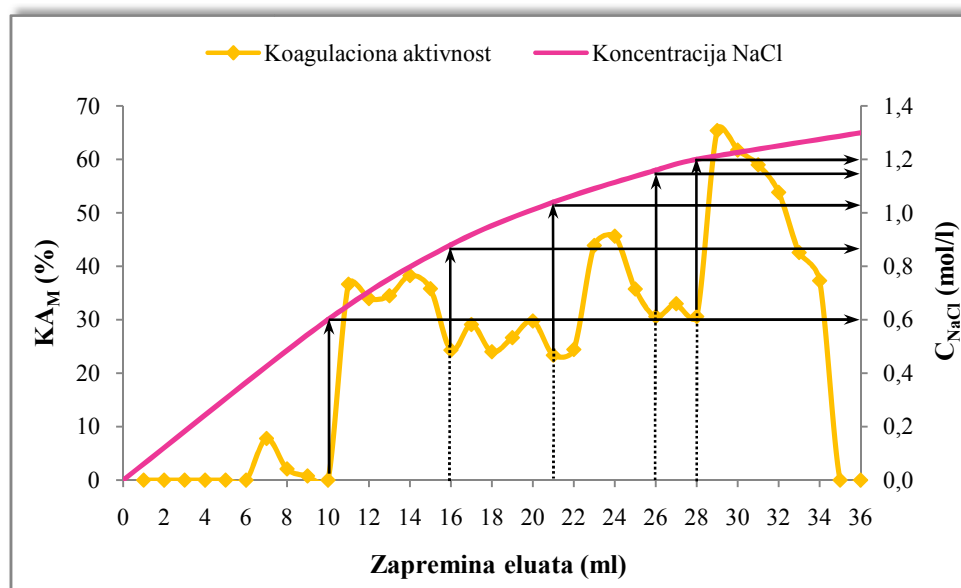


**Slika 64.** Koncentracija proteina i koagulaciona aktivnost frakcija sakupljenih tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 36 minuta

Sa dijagrama (Slika 64) je uočljivo da se najveće koagulacione aktivnosti dobijaju kod primene frakcija od 29-e do 32-e, pri čemu se maksimalna koagulaciona aktivnost, 65,43%, postiže sa 29-om frakcijom. Takođe, poklapanje proteinskih i koagulacionih pikova je samo delimično, što vodi zaključku da se za frakcionisanje proteina iz dijalizata sa ciljem dobijanja čistijih koagulanata ne mogu isključivo posmatrati sadržaji proteina u frakcijama, jer veliki sadržaj proteina ne mora obavezno značiti i veliku koagulacionu aktivnost, i obrnuto.

Prelaskom na eluiranje u eksponencijalnom gradijentu koncentracije eluenta postiže se nešto veća maksimalna koagulaciona aktivnost u poređenju sa eluiranjem u linearnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 2 mol/l (Slika 62), gde je maksimalna koagulaciona aktivnost, koja je postignuta sa 23-om frakcijom, oko 50%.

Na osnovu položaja koagulacionih pikova, odabrane su vrednosti koncentracije rastvora NaCl kojima će se u sledećem ogledu izvesti stupnjevito eluiranje vezanih proteina, sa ciljem da se u tako dobijenim frakcijama nađu razdvojeni upravo oni proteini koji su dali pikove kod koagulacione aktivnosti. Šema po kojoj su određene koncentracije rastvora NaCl za eluiranje je prikazana na Slici 65.



**Slika 65.** Šema (na osnovu rezultata eluiranja u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 36 minuta) za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se eluirati odgovarajući proteini tokom kontinualnog postupka vezivanja i stupnjevitog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl

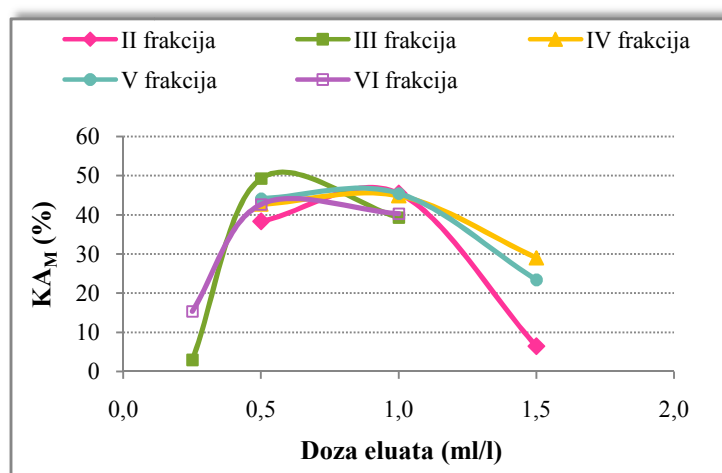
Na osnovu šeme prikazane na Slici 65, određene su sledeće koncentracije rastvora NaCl u 0,05 mol/l fosfatnom puferu (pH 7,5) kojima će se sukcesivno eluirati proteini vezani za jonoizmenjivačku smolu, i na taj način dobiti odgovarajuće frakcije:

- I frakcija: 0,60 mol/l NaCl,
- II frakcija: 0,88 mol/l NaCl,
- III frakcija: 1,04 mol/l NaCl,
- IV frakcija: 1,16 mol/l NaCl,
- V frakcija: 1,20 mol/l NaCl, i
- VI frakcija: 1,30 mol/l NaCl.

Na jonoizmenjivačku smolu u koloni je nanet dijalizat i izvedeno vezivanje proteina pri istim uslovima kao u prethodnim ogledima. Nakon ispiranja proteina koji se nisu vezali, proteini sa smole su eluirani rastvorima NaCl rastuće koncentracije prema gore navedenoj šemi. U šest, na taj način dobijenih frakcija, je određena koncentracija proteina (podaci u Tabeli 11), a zatim ispitana njihova koagulaciona aktivnost pri različitim dozama u model vodi početne mutnoće 35 NTU i pH vrednosti 9 (rezultati prikazani na grafiku na Slici 66). Frakcija dobijena eluiranjem sa 0,6 mol/l rastvorom NaCl nije pokazivala koagulacionu aktivnost ni pri jednoj ispitivanoj dozi.

**Tabela 11.** Koncentracija proteina u frakcijama dobijenim stupnjevitim eluiranjem sa 0,60 mol/l, 0,88 mol/l, 1,04 mol/l, 1,16 mol/l, 1,20 mol/l i 1,30 mol/l rastvorom NaCl, u koloni

Frakcija:	Eluiranje proteina rastvorima NaCl (mol/l):	Koncentracija proteina u frakcijama (mg/ml):
I	0,60	0,0013
II	0,88	0,0528
III	1,04	0,0276
IV	1,16	0,0180
V	1,20	0,0048
VI	1,30	0,0324

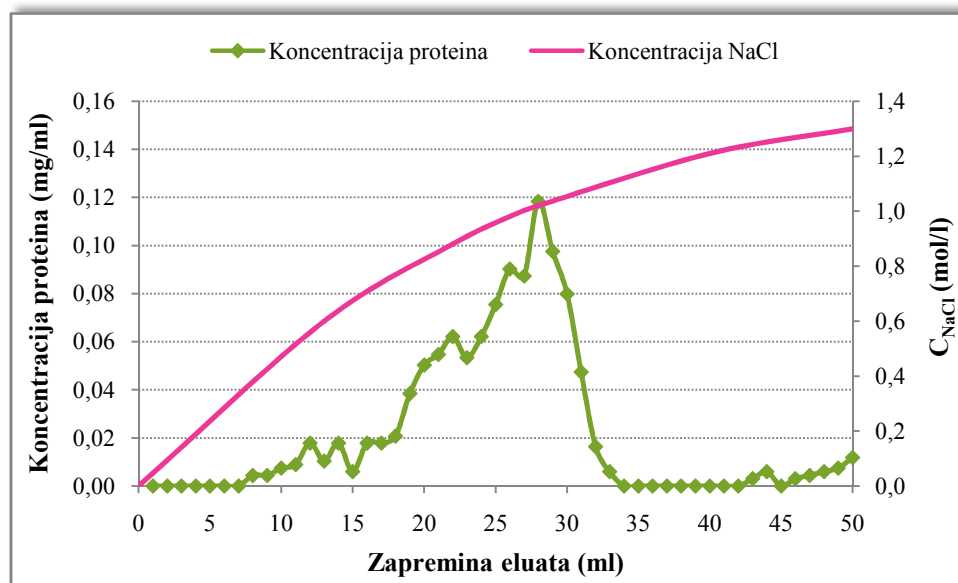


**Slika 66.** Koagulacione aktivnosti frakcija dobijenih kolonskom hromatografijom na jonoizmenjivačkoj smoli Amberlite™ IRA 900Cl pri stupnjevitom eluiranju rastvorima NaCl koncentracija 0,60 mol/l, 0,88 mol/l, 1,04 mol/l, 1,16 mol/l, 1,20 mol/l i 1,30 mol/l

Sa grafika se vidi da sve frakcije imaju slične vrednosti maksimalnih koagulacionih aktivnosti. Kada se pogledaju koncentracije proteina u frakcijama, zanimljivo je da V frakcija postiže koagulacionu aktivnost kao i ostale frakcije, bez obzira na to što ima veoma mali sadržaj proteina, npr. čak oko 10 puta manji od II frakcije. Takođe, III frakcija, koja je pokazala i najveću koagulacionu aktivnost (oko 50%), pri duplo manjoj dozi je efikasnija od II frakcije koja pri tome ima oko 2 puta veću koncentraciju proteina. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima prikazanim na Slici 59 može se primetiti da se na ovaj način dobijaju frakcije koje najbolju koagulacionu aktivnost postižu pri dozi 0,5 ml/l i ona se kreće u opsegu od 38% – 50%, dok se u šaržnom postupku (Slika 59) dobijaju frakcije koje pri ovoj dozi imaju značajno nižu koagulacionu aktivnost, od 9% – 22%. Frakcije dobijene šaržnim postupkom (Slika 59) ipak mogu da postignu približnu koagulacionu aktivnost kao frakcije prikazane na Slici 66, ali pri duplo većoj dozi, 1 ml/l.

Kako ni prethodnim postupkom eluiranja (eksponencijalni gradijent koncentracije rastvora NaCl od 0 – 1,3 mol/l, 36 minuta) nije postignuto dobro razdvajanje proteina, i kako bi se postigli bolji rezultati u tom smislu, u sledećem koraku je izvedeno vezivanje i eluiranje proteina sa jonoizmenjivačke smole u istom gradijentu koncentracije rastvora NaCl, tj. eksponencijalnom gradijentu koncentracije od 0 – 1,3 mol/l, ali ovog puta je produženo vreme postizanja tog gradijenta, odnosno eluiranja, na 50 minuta, kako bi se koncentracija rastvora

NaCl sporije povećavala. Na jonizmenjivačku smolu je naneto 0,276 ml dijalizata u kome je koncentracija proteina iznosila 7,2411 mg/ml. Tokom eluiranja je sakupljeno 50 frakcija zapremine 1 ml u kojima je određena koncentracija proteina. Elucioni dijagram je prikazan na Slici 67.

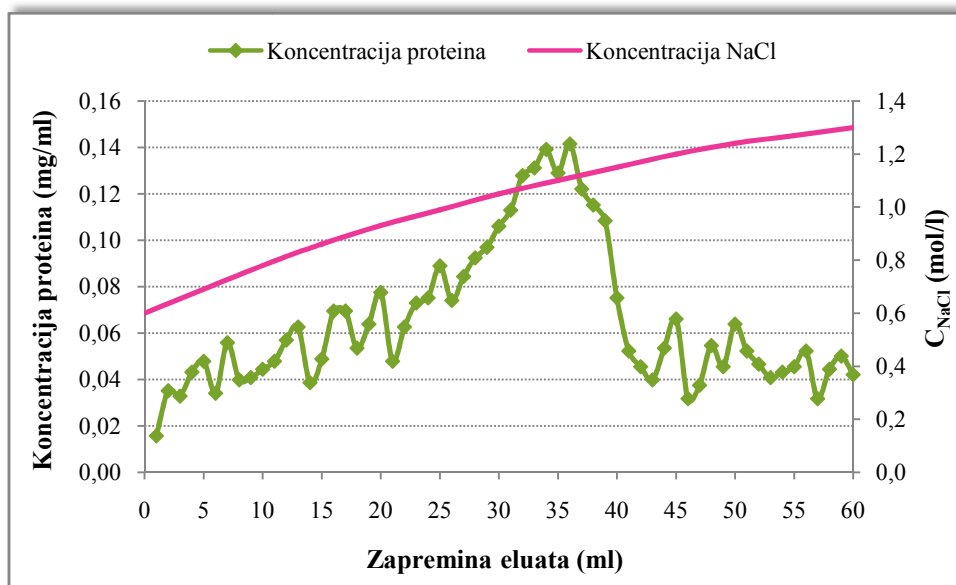


**Slika 67.** Koncentracija proteina u frakcijama sakupljenim tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 50 minuta

Kao što se sa elucionog dijagrama vidi, ni produženjem vremena eluiranja na 50 minuta u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 mol/l do 1,3 mol/l nije postignuto dobro razdvajanje proteina, odnosno pikovi se preklapaju u velikoj meri. S obzirom na takve rezultate, i na to da frakcija proteina u ranijem ogledu (sukcesivno eluiranje proteina sa šest rastvora NaCl rastuće koncentracije – šema eluiranja dobijena nakon kontinualnog eluiranja proteina u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0 – 1,3 mol/l u toku 36 minuta) koja se eluira rastvorom NaCl koncentracije 0,6 mol/l nije imala koagulacionu aktivnost, javila se ideja da se pokuša još jednom sa eluiranjem proteina u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl, ovog puta od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l u trajanju od 60 minuta.

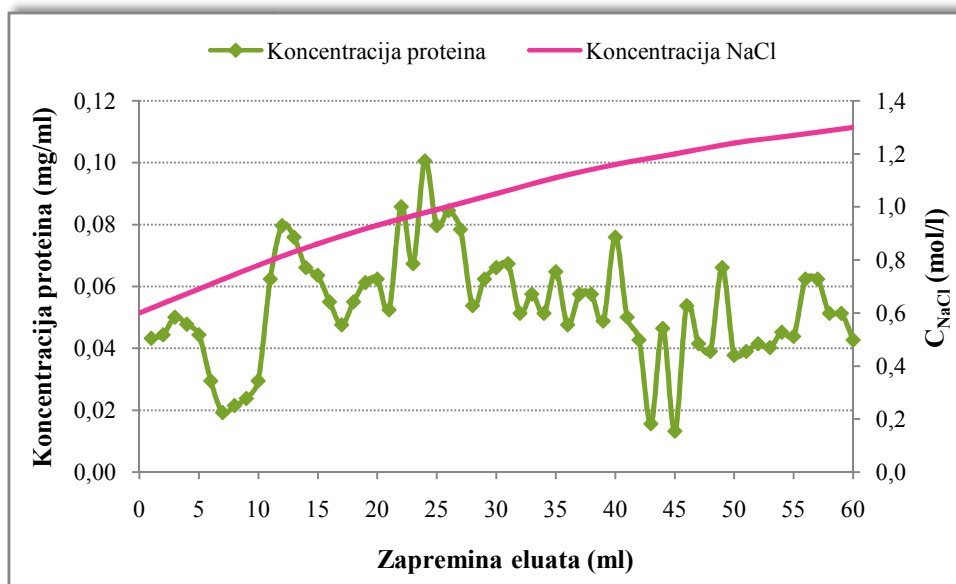
U kolonu sa jonoizmenjivačkom smolom Amberlite™ IRA 900Cl je naneto 0,163 ml dijalizata sa koncentracijom proteina 12,2942 mg/ml. Vezivanje proteina je izvedeno kao u prethodnim slučajevima, a nakon ispiranja proteina koji se nisu vezali, izvedeno je eluiranje u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l u toku 60 minuta, pri čemu su sakupljane frakcije zapremine 1 ml. U frakcijama je određena koncentracija proteina i rezultati su prikazani na elucionom dijagramu (Slika 68).

Na elucionom dijagramu (Slika 68) se primećuje jedan veći pik od 21-e do 43-e frakcije, koji se ponovo sastoji od više nedovoljno dobro razdvojenih pikova, i pored njega veći broj malih proteinskih pikova. S obzirom na to da u ovom slučaju eluiranje započinje rastvorom NaCl koncentracije 0,6 mol/l, u prikupljenim frakcijama će se nalaziti i proteini koji su u prethodnim slučajevima eluirani do te koncentracije, a koji nisu bili koagulaciono aktivni, i koji mogu zaklanjati, odnosno preklapati se sa nekim od pikova koji se javljaju pri koncentracijama rastvora NaCl većim od 0,6 mol/l.



**Slika 68.** Koncentracija proteina u frakcijama sakupljenim tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 60 minuta

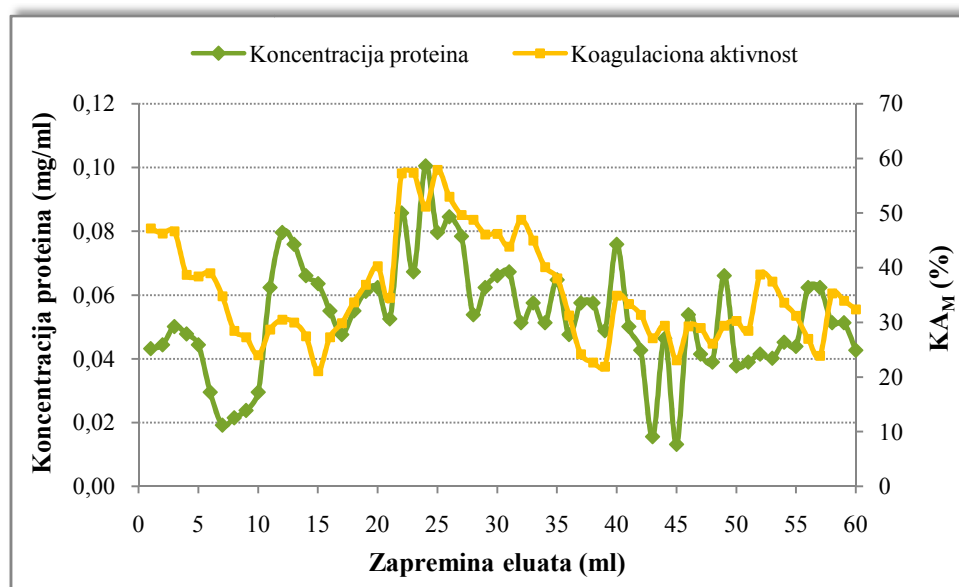
Stoga je odlučeno da se još jednom izvede vezivanje proteina za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl (na smolu naneto 0,163 ml dijalizata sa koncentracijom proteina 12,2942 mg/ml), smola pre eluiranja ispere sa 30 ml rastvora NaCl koncentracije 0,6 mol/l, kako bi se u toj frakciji sa smole skinula gore pomenuta grupa proteina, a zatim izvede eluiranje u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 – 1,3 mol/l za vreme od 60 minuta, pri čemu će zapremina frakcija biti 1 ml. U tako dobijenim frakcijama je određena koncentracija proteina, što je prikazano na elucionom dijagramu na Slici 69.



**Slika 69.** Koncentracija proteina u frakcijama sakupljenim tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 60 minuta, uz prethodno eluiranje 0,6 mol/l rastvorom NaCl

Na elucionom dijagramu (Slika 69) se izdvajaju dva veća pika, čiji su maksimumi u 24-oj i 12-oj frakciji, i pored njih veći broj manjih pikova koji su veoma bliski. Ovakav dijagram govori da dijalizat dobijen iz ekstrakta semena pasulja sadrži veći broj proteina koji su veoma slični po naelektrisanju, pa se na ovaj način ne mogu u potpunosti dobro razdvojiti. Do sličnog zaključka o heterogenosti proteina prisutnih u vodenom i NaCl-ekstraktu *M. oleifera*-e su došli i Ghebremichael i saradnici (2005) prečišćavajući ove ekstrakte na katjionskoj jonoizmenjivačkoj smoli, s tim što su oni na elucionom dijagramu i jednog i drugog ekstrakta dobili po 3 proteinska pika, što ukazuje na to da je proteinski sastav ekstrakta pasulja još kompleksniji u poređenju sa ekstraktom *M. oleifera*-e.

Za dobijene frakcije je utvrđena koagulaciona aktivnost u model vodi početne mutnoće 200 NTU i pH vrednosti 9, pri dozi 0,4 ml/l. Na Slici 70 su prikazani dobijeni rezultati, uporedo sa sadržajem proteina u frakcijama.

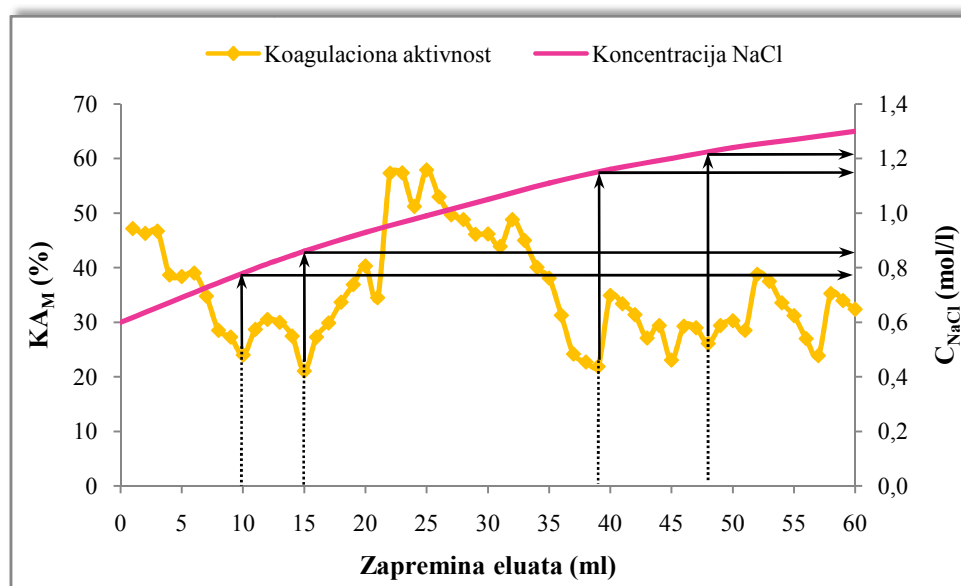


**Slika 70.** Koncentracija proteina i koagulaciona aktivnost frakcija sakupljenih tokom kontinualnog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 60 minuta, uz prethodno eluiranje 0,6 mol/l rastvorom NaCl

Sa dijagrama se može uočiti da u određenim delovima postoji poklapanje koagulacionih pikova sa proteinskim pikovima i isti trend krivih za koagulacionu aktivnost i koncentraciju proteina. U oblasti najvećih koncentracija proteina se javljaju i najviše koagulacione aktivnosti. Ipak, može se uočiti i suprotan trend krivih u nekim delovima, tj. rast koncentracije proteina, a pad koagulacione aktivnosti. Takođe, u nekim delovima se javlja izvesna pomenost pikova koagulacione aktivnosti u odnosu na proteinske pikove. Potencijalno objašnjenje za to bi mogla biti neodgovarajuća doza, s obzirom da su testovi koagulacije za sve frakcije izvedeni pri istoj dozi od 0,4 ml/l, što svakako nije optimalna doza za svaku od frakcija.

Na osnovu koagulacionih aktivnosti frakcija i krive za gradijent koncentracije rastvora natrijum-hlorida tokom eluiranja, napravljena je šema (Slika 71) za eluiranje u sledećem ogledu, u kome će proteini iz dijalizata prvo biti vezani za jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl pri istim uslovima kao u prethodnom ogledu, a zatim eluirani sukcesivno rastvorima NaCl rastuće koncentracije.





**Slika 71.** Šema (na osnovu rezultata eluiranja u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 60 minuta) za određivanje koncentracija rastvora NaCl kojima će se eluirati odgovarajući proteini tokom kontinualnog postupka vezivanja i stupnjevitog eluiranja proteina vezanih na jonoizmenjivačku smolu Amberlite™ IRA 900Cl

Na osnovu šeme (Slika 71) određene su sledeće koncentracije rastvora NaCl u 0,05 mol/l fosfatnom puferu (pH 7,5) kojima će se sukcesivno eluirati proteini vezani za jonoizmenjivačku smolu, i na taj način dobiti odgovarajuće frakcije:

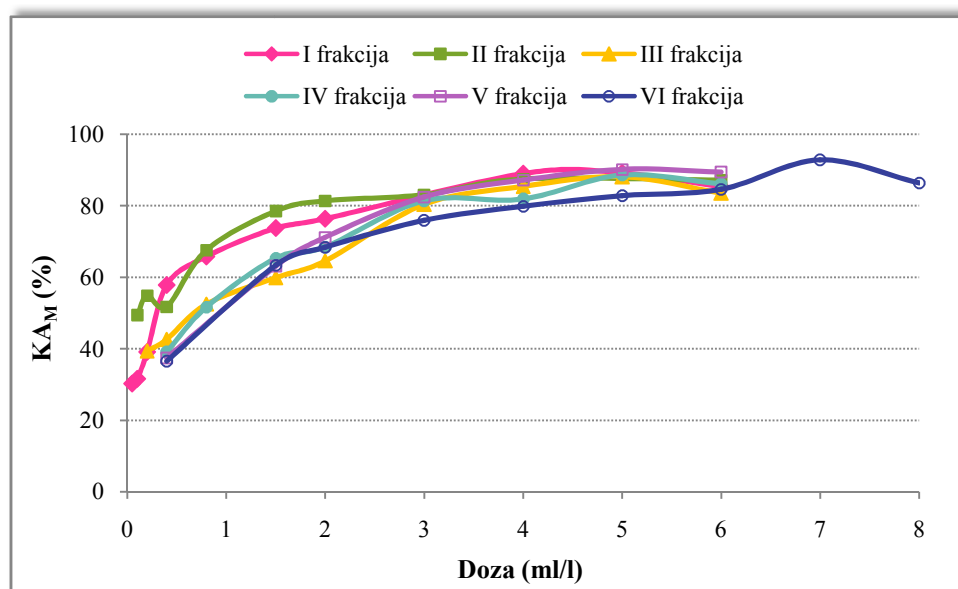
- I frakcija: 0,50 mol/l NaCl,
- II frakcija: 0,78 mol/l NaCl,
- III frakcija: 0,86 mol/l NaCl,
- IV frakcija: 1,14 mol/l NaCl,
- V frakcija: 1,21 mol/l NaCl, i
- VI frakcija: 1,30 mol/l NaCl.

Kako bi koagulacioni pik koji se javlja u oblasti od 1-e frakcije (odgovara joj koncentracija rastvora NaCl 0,6 mol/l) do 10-e frakcije (odgovara joj koncentracija rastvora NaCl 0,78 mol/l) bio uhvaćen u jednu frakciju, I frakcija nije bila eluirana sa 0,6 mol/l rastvorom NaCl, već sa 0,5 mol/l. U dobijenim frakcijama je određena koncentracija proteina, a rezultati su prikazani u Tabeli 12.

**Tabela 12.** Koncentracija proteina u frakcijama dobijenim stupnjevitim eluiranjem sa 0,50 mol/l, 0,78 mol/l, 0,86 mol/l, 1,14 mol/l, 1,21 mol/l i 1,30 mol/l rastvorom NaCl, u koloni

Frakcija:	Eluiranje proteina rastvorima NaCl (mol/l):	Koncentracija proteina u frakcijama (mg/ml):
I	0,50	0,0859
II	0,78	0,0707
III	0,86	0,0382
IV	1,14	0,0240
V	1,21	0,0108
VI	1,30	0,0047

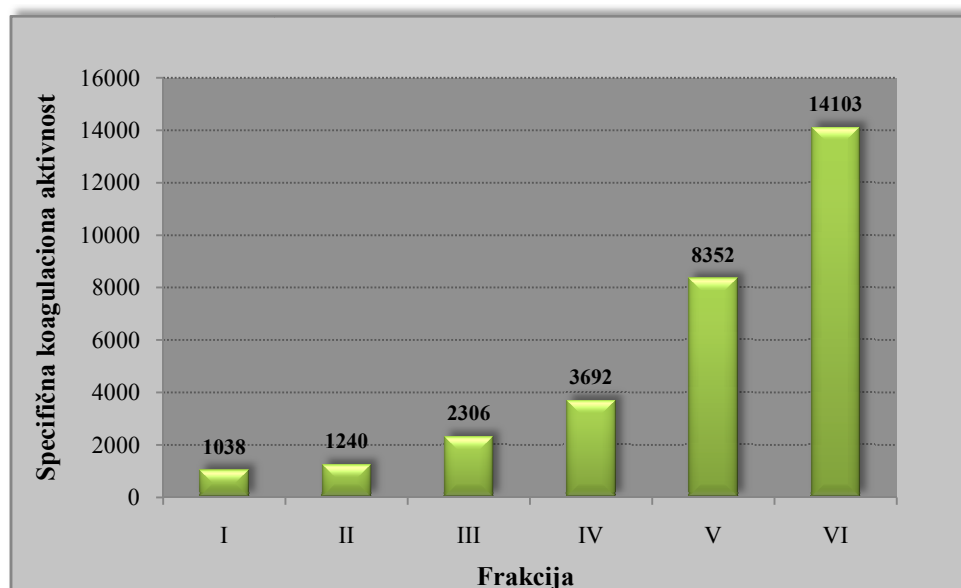
Frakcije su zatim primenjene u različitim dozama kao koagulanti u testovima koagulacije u model vodi početne mutnoće 200 NTU i pH vrednosti 9. Zavisnost njihove koagulacione aktivnosti od primenjene doze je prikazana na Slici 72.



**Slika 72.** Koagulacione aktivnosti frakcija dobijenih kolonskom hromatografijom na jonoizmenjivačkoj smoli Amberlite™ IRA 900Cl pri stupnjevitom eluiranju rastvorima NaCl koncentracija 0,50 mol/l, 0,78 mol/l, 0,86 mol/l, 1,14 mol/l, 1,21 mol/l i 1,30 mol/l

Sa grafika na Slici 72 se da primetiti da sve frakcije imaju veoma slično koagulaciono ponašanje i postižu visoku koagulacionu aktivnost, koja je veća od koagulacionih aktivnosti pojedinačnih frakcija proteina dobijenih kontinualnim eluiranjem (Slika 71), a koje su sadržane u ovim frakcijama dobijenim stupnjevitim eluiranjem. Maksimalne koagulacione aktivnosti ovih šest frakcija imaju približne vrednosti. Sa porastom doze, odnosno unošenjem veće količine proteina, raste i koagulaciona aktivnost do postizanja maksimuma. Zanimljivo je da je najveću koagulacionu aktivnost od 92,8% postigla VI frakcija, koja ima najmanju koncentraciju proteina, pri dozi od 7 ml/l. Sve ostale frakcije svoje maksimume, koji se kreću od 87,7% do 90,2%, postižu pri dozi od 5 ml/l, ali ipak i pri upola nižoj dozi (2,5 ml/l) one postižu koagulacione aktivnosti približne maksimalnim. U testovima koagulacije u kojima se koagulaciona aktivnost kretala oko maksimalne za datu frakciju, obrazovale su se veoma krupne flokule, vidljive golim okom, koje su se i taložile dosta brzo. Kada se rezultati prikazani na Slici 72 (koagulaciona aktivnost frakcija u model vodi početne mutnoće 200 NTU) uporede sa rezultatima prikazanim na Slici 66 (koagulaciona aktivnost frakcija u model vodi početne mutnoće 35 NTU), vidi se da IV, V i VI frakcija (koje su u ta dva slučaja eluirane rastvorima NaCl slične koncentracije) i u jednom i u drugom slučaju pri dozi od 0,5 ml/l imaju sličnu koagulacionu aktivnost koja se kreće oko 40%, iako se razlikuju po sadržaju proteina. Ipak, u model vodi veće početne mutnoće (Slika 72) sa daljim povećanjem doze dolazi i do povećanja koagulacione aktivnosti sve do maksimuma od oko 90%, dok se u model vodi male početne mutnoće (Slika 66) povećanjem doze ne može postići bolja efikasnost uklanjanja mutnoće.

Kako bi se sagledao odnos maksimalne koagulacione aktivnosti svake frakcije i količine unetih proteina, na sledećem histogramu (Slika 73) su prikazane specifične koagulacione aktivnosti frakcija.



**Slika 73.** Specifične koagulacione aktivnosti frakcija proteina dobijenih stupnjevitim eluiranjem u kolonskoj hromatografiji na jonoizmenjivačkoj smoli Amberlite™ IRA 900Cl

Kada se na ovakav način prikaže koagulaciona aktivnost (kao specifična), vidi se da su daleko najaktivniji proteini prisutni u VI frakciji. Ovakvim načinom prečišćavanja/frakcionisanja prirodnih koagulanata iz ekstrakta pasulja se dobijaju frakcije koje su znatno aktivnije u poređenju sa frakcijama koje se dobijaju na istom jonoizmenjivaču u šaržnom postupku (Slika 60), ali tada je koagulaciona aktivnost određivana u model vodi početne mutnoće 35 NTU.

Nakon sagledavanja rezultata dobijenih izdvajanjem i prečišćavanjem proteina iz ekstrakta pasulja na različitim jonoizmenjivačkim smolama, može se izvesti zaključak da se unapređivanjem prečišćavanja mogu dobiti proteinske frakcije koje su bitno aktivnije u smislu uklanjanja mutnoće vode. Takođe, od ispitivanih anjonita, najboljim se pokazao Amberlite™ IRA 900Cl, s obzirom na to da su njegovom primenom dobijene frakcije proteina sa veoma visokom koagulacionom aktivnošću, koja se kreće oko 90%.

#### **4.7. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA FRAKCIONISANJEM ULTRAFILTRACIJOM**

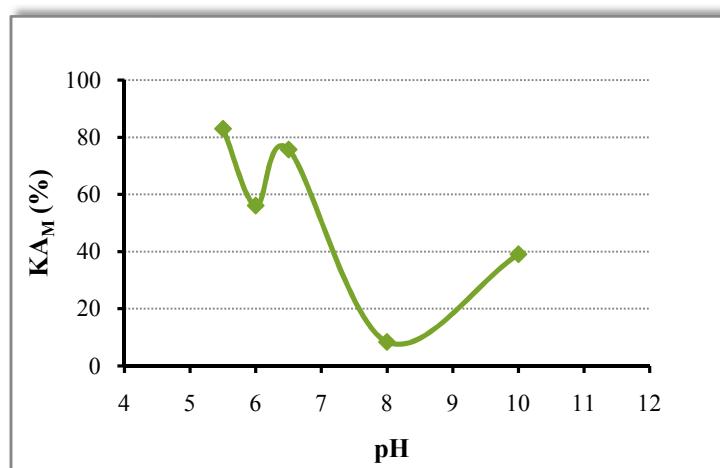
Ultrafiltracija predstavlja membranski proces, pri kome se molekuli prisutni u rastvoru razdvajaju na osnovu njihovih veličina, a u ovom radu je primenjena s ciljem da se iz sirovog ekstrakta pasulja pokušaju ukloniti molekuli jedinjenja koja ne poseduju koagulacionu aktivnost, a svojim prisustvom u ekstraktu doprinose povećanju sadržaja organskih materija u obrađenoj vodi, i da se na taj način dobije čistiji koagulant.

Pre samog frakcionisanja sirovog ekstrakta pasulja (dobijen ekstrakcijom sa destilovanom vodom pri ekstrakcionom odnosu 1:20), izvedena je optimizacija parametara koji utiču na koagulaciju i utvrđena njegova koagulaciona aktivnost pri tim optimalnim uslovima. Optimizacija parametara koji utiču na koagulaciju je izvedena primenom metode odzivne površine (metoda je opisana u poglavlju 3.7.). Ispitivani faktori i njihovi nivoi u kodiranim i stvarnim vrednostima su prikazani u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Eksperimentalni faktori i njihovi nivoi

Faktor (varijabla):	Nivo:		
	(-1)	(0)	(+1)
$v_1$ – početna mutnoća model vode (NTU)	170	195	220
$v_2$ – pH model vode	5,5	6,0	6,5
$v_3$ – doza koagulanta (ml/l)	0,40	0,65	0,90

Opseg vrednosti za početnu mutnoću model vode je izabran na osnovu literaturnih podataka koji ukazuju na to da prirodni koagulanti postižu bolju efikasnost uklanjanja suspendovanih čestica iz mutnijih voda (Ghebremichael et al., 2009; Nkurunziza et al., 2009; Pritchard et al., 2009; Pritchard et al., 2010b), kao i na osnovu rezultata prikazanih u okviru ovog rada, u poglavljima 4.5.6. i 4.5.7. Opseg pH vrednosti model vode je izabran na osnovu predeksperimentata u kojima je detaljnije ispitivan uticaj pH vrednosti model vode početne mutnoće 200 NTU na koagulacionu aktivnost sirovog ekstrakta pasulja pri dozi 0,4 ml/l. Rezultati ovih eksperimenata su prikazani na Slici 74, i u skladu su sa rezultatima ispitivanja uticaja pH vrednosti na koagulacionu aktivnost prikazanim na Slici 32. Niže vrednosti od pH 5,5 nisu uzimane u razmatranje jer su preniske, i za postizanje tih pH vrednosti bi bilo potrebno utrošiti značajne količine rastvora kiseline.

**Slika 74.** Uticaj pH vrednosti model vode početne mutnoće 200 NTU na koagulacionu aktivnost sirovog vodenog ekstrakta pasulja

Kako bi se definisala polinomna regresiona jednačina i odnos između ulaznih faktora (početna mutnoća i pH model vode, i doza koagulanta) i odziva (uklanjanje mutnoće izraženo preko koagulacione aktivnosti,  $KA_M$ ), a uz izvođenje minimalnog potrebnog broja eksperimenata, primenjen je Box-Behnken-ov dizajn. Box-Behnken-ov eksperimentalni plan, zajedno sa dobijenim odzivima za sirovi vodeni ekstrakt zrna pasulja kao koagulant, dat je u Tabeli 14.

**Tabela 14.** Box-Behnken-ov eksperimentalni plan i odzivi za sirovi vodeni ekstrakt zrna pasulja kao koagulant

Redni broj eksperimenta:	Nezavisno promenljive (kodirane vrednosti):			Odziv:
	$v_1$	$v_2$	$v_3$	$KA_M$ (%)
1	-1	-1	0	75,7
2	+1	-1	0	76,7
3	-1	+1	0	72,4
4	+1	+1	0	77,9
5	-1	0	-1	78,2
6	+1	0	-1	81,5
7	-1	0	+1	68,0
8	+1	0	+1	77,0
9	0	-1	-1	82,9
10	0	+1	-1	75,6
11	0	-1	+1	69,8
12	0	+1	+1	74,7
13	0	0	0	58,1
14	0	0	0	61,2
15	0	0	0	59,5

Odziv ( $KA_M$ ) je fitovan sa tri ispitivane nezavisno promenljive primenom polinomne jednačine drugog reda (9). Vrednosti dobijenih koeficijenata determinacije, kao i analiza varijanse (ANOVA) kvadratnog regresionog modela su dati u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Koeficijenti u kvadratnoj regresionoj jednačini, F- i p-vrednosti i koeficijenti determinacije za sirovi vodeni ekstrakt zrna pasulja kao koagulant

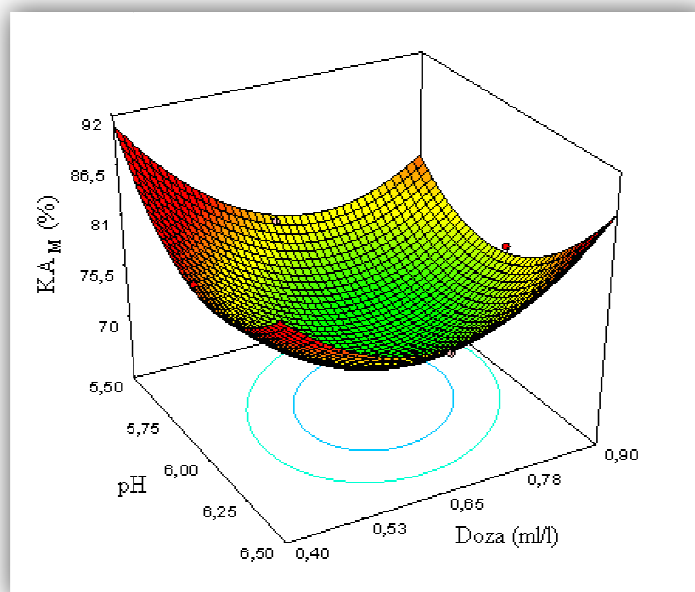
Koeficijenti u regresionoj jednačini:	Procenjena vrednost	F-vrednost	p-vrednost
$b_0$	1971,71350	/	/
$b_1$	-5,74220	24,28	0,0044
$b_2$	-410,13500	1,39	0,2913
$b_3$	-378,37000	56,59	0,0007
$b_{12}$	0,09000	2,78	0,1562
$b_{13}$	0,22800	4,46	0,0883
$b_{23}$	24,40000	20,45	0,0063
$b_{11}$	0,013200	138,12	<0,0001
$b_{22}$	31,30000	124,26	0,0001
$b_{33}$	133,20000	140,64	<0,0001
<b>Koeficijenti determinacije:</b>	$R^2$ 0,9892	$R^2_{adj}$ 0,9698	$R^2_{pred}$ 0,9061

\* p-vrednosti manje od 0,05 ukazuju na to da je varijabla u modelu značajna

\* koeficijenti su dati u stvarnim vrednostima

Pošto je cilj ovih eksperimenata bio da se razvije model koji će predviđati odziv ( $K_{A_M}$ ), koeficijenti determinacije  $R^2_{pred}$  i  $R^2_{adj}$  treba da budu bliski po svojoj vrednosti i na taj način ukažu na dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa dobijenim modelom. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 15 može se zaključiti da su  $v_1$ ,  $v_3$ ,  $v_2v_3$ ,  $v_1^2$ ,  $v_2^2$ ,  $v_3^2$  značajne varijable modela. Pozitivan predznak koeficijenta u regresionoj jednačini ukazuje na njegov sinergistički efekat, dok negativan predznak ukazuje na antagonistički efekat. U ispitivanom slučaju vrednosti koje predviđa model se dobro slažu sa stvarnim eksperimentalnim vrednostima. Takođe, F-vrednost modela 51,03 i p-vrednost modela 0,0002 ukazuju da je sam model značajan.

Grafički prikaz (3D grafik) dobijenog modela omogućava sagledavanje uticaja eksperimentalnih parametara na odziv. Grafik na Slici 75 prikazuje sa kvalitativne strane uticaj pH vrednosti model vode i doze primenjenog koagulanta na uklanjanje mutnoće u model vodi čija je početna mutnoća iznosila 220 NTU (ova početna mutnoća model vode je izabrana s obzirom na to da je cilj optimizacije u ovom slučaju određivanje uslova za dobijanje maksimalnog odziva, a u model vodi veće početne mutnoće se postižu veće koagulacione aktivnosti u odnosu na model vodu sa manjom početnom mutnoćom). Kako se sa Slike 75 može primetiti, rad pri nižoj pH vrednosti model vode i sa nižom dozom sirovog ekstrakta vodi povećanju koagulacione aktivnosti u smislu uklanjanja mutnoće. Na pH 6 je koagulaciona aktivnost nešto niža, što je u skladu sa rezultatima prikazanim na Slici 74.



**Slika 75.** Uticaj pH vrednosti model vode i doze sirovog vodenog ekstrakta zrna pasulja na njegovu koagulacionu aktivnost u model vodi početne mutnoće 220 NTU

U okviru ispitivanog regiona su, kao optimalni uslovi za postizanje maksimalnog uklanjanja mutnoće od 91%, utvrđeni: početna mutnoća model vode 220 NTU, pH model vode 5,5 i doza sirovog ekstrakta pasulja 0,4 ml/l. Kako bi se praktično potvrdila podesnost dobijenog modela, izvedena su tri nezavisna testa koagulacije pri ovim optimalnim uslovima, pri čemu je postignuta srednja vrednost koagulacione aktivnosti od 88,5%. Ova vrednost je bliska prognoziranoj vrednosti, i nalazi se u opsegu između donje i gornje vrednosti 95% PI (*prediction interval*). Ova koagulaciona aktivnost se može smatrati veoma dobrom s obzirom da se prema literaturnim podacima za koagulacionu aktivnost ekstrakta *M. oleifera*-e kao najviše ispitivanog prirodnog koagulanta ona kreće u opsegu od 74 – 100% (Nkurunziza et al., 2009; Pritchard et al., 2009; Pritchard et al., 2010a).

Nakon utvrđivanja koagulacione aktivnosti sirovog vodenog ekstrakta pasulja, on je podvrgnut frakcionisanju ultrafiltracijom po postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Ultrafiltracija je dala četiri frakcije koje su zatim bile primenjene kao koagulant pri istim uslovima kao sirovi ekstrakt: početna mutnoća model vode 220 NTU, pH model vode 5,5 i doza frakcija 0,4 ml/l. Dobijeni rezultati izraženi kao koagulaciona aktivnost ( $K_{AM}$ ) su prikazani u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Koagulacione aktivnosti frakcija dobijenih ultrafiltracijom sirovog vodenog ekstrakta pasulja

Koagulant:	$K_{AM}$ (%):
I frakcija ( $M < 5000$ Da)	18,9
II frakcija ( $5000 < M < 10000$ Da)	19,5
III frakcija ( $10000 < M < 30000$ Da)	43,2
IV frakcija ( $M > 30000$ Da)	74,9

Kako se iz Tabele 16 može videti, I, II, pa čak i III frakcija su pokazale nisku koagulacionu aktivnost, dok je IV frakcija postigla visoku efikasnost uklanjanja mutnoće koja je bliska onoj koju je pokazao sirovi ekstrakt od koga su frakcije dobijene. Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da su glavni nosioci koagulacione aktivnosti u sirovom ekstraktu pasulja molekuli čija je molekulska masa iznad 30 kDa, dok molekuli nižih molekulskih masa ne poseduju značajniju sposobnost uklanjanja suspendovanih čestica.

Kako bi se maksimizovala koagulaciona aktivnost IV frakcije, izvedena je optimizacija procesnih parametara primenom metode odzivne površine. Eksperimentalni plan zajedno sa dobijenim odzivima je prikazan u Tabeli 17.

**Tabela 17.** Box-Behnken-ov eksperimentalni plan i odzivi za IV frakciju (dobijenu ultrafiltracijom) kao koagulant

Redni broj eksperimenta:	Nezavisno promenljive (kodirane vrednosti):			Odziv:
	$v_1$	$v_2$	$v_3$	$K_{AM}$ (%)
1	-1	-1	0	62,8
2	+1	-1	0	71,2
3	-1	+1	0	63,0
4	+1	+1	0	68,9
5	-1	0	-1	59,8
6	+1	0	-1	65,7
7	-1	0	+1	67,2
8	+1	0	+1	69,3
9	0	-1	-1	76,1
10	0	+1	-1	76,6
11	0	-1	+1	83,3
12	0	+1	+1	76,9
13	0	0	0	64,8
14	0	0	0	65,5
15	0	0	0	63,8

Kao i u slučaju sirovog vodenog ekstrakta kao koagulanta, odziv ( $KA_M$ ) je fitovan sa ispitivanim varijablama primenom polinoma drugog reda (9). Dobijene vrednosti koeficijenata determinacije ( $R^2$ ), kao i ANOVA analiza kvadratnog regresionog modela prikazani su u Tabeli 18. Prema ovim rezultatima, pet faktora imaju p-vrednost ispod granice značajnosti od 0,05, što znači da su statistički značajni faktori modela. To su  $v_1$ ,  $v_3$ ,  $v_1^2$ ,  $v_2^2$  i  $v_3^2$ . Takođe, na osnovu F-vrednosti modela od 34,18 i p-vrednosti modela od 0,0006 može se reći da je model značajan.

**Tabela 18.** Koeficijenti u kvadratnoj regresionoj jednačini, F- i p-vrednosti i koeficijenti determinacije za IV frakciju (dobijenu ultrafiltracijom) kao koagulant

Koeficijenti u regresionoj jednačini:	Procenjena vrednost	F-vrednost	p-vrednost
$b_0$	670,67900	/	/
$b_1$	3,92670	31,85	0,0024
$b_2$	-331,28000	4,10	0,0988
$b_3$	-8,83000	21,92	0,0054
$b_{12}$	-0,050000	0,80	0,4119
$b_{13}$	-0,15200	1,85	0,2319
$b_{23}$	-13,80000	6,10	0,0566
$b_{11}$	$-8,76000 \cdot 10^{-3}$	56,71	0,0007
$b_{22}$	29,00000	99,45	0,0002
$b_{33}$	100,40000	74,50	0,0003
<b>Koeficijenti determinacije:</b>	<b><math>R^2</math></b> 0,9840	<b><math>R^2_{adj}</math></b> 0,9552	<b><math>R^2_{pred}</math></b> 0,7770

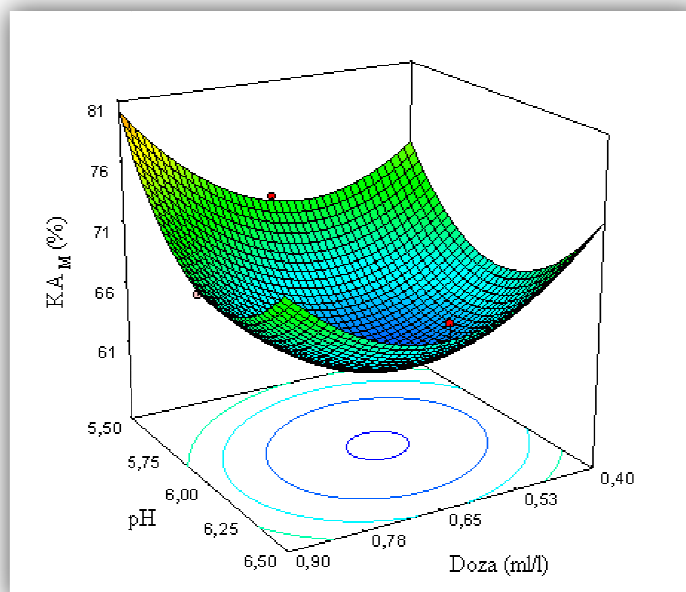
\*p-vrednosti manje od 0,05 ukazuju na to da je varijabla u modelu značajna

\* koeficijenti su dati u stvarnim vrednostima

3D grafik sa odzivnom površinom za dobijeni model je prikazan na Slici 76 i ilustruje uticaj pH vrednosti model vode i doze IV frakcije na efikasnost uklanjanja mutnoće u model vodi početne mutnoće 220 NTU.

Kako se sa slike može videti, najveća koagulaciona aktivnost od 80,6% se može postići pri najnižoj ispitivanoj pH vrednosti model vode i dodatkom najveće ispitivane doze IV frakcije. Kako bi se praktično proverila validnost dobijenog modela, izvedena su tri odvojena testa koagulacije u model vodi početne mutnoće 220 NTU i pH vrednosti 5,5, sa dozom IV frakcije 0,9 ml/l. Srednja vrednost dobijene koagulacione aktivnosti je iznosila 79,8%, i nalazi se u opsegu između donje i gornje vrednosti 95% PI. Takođe, značajno je naglasiti da je ova koagulaciona aktivnost u odnosu na koagulacionu aktivnost sirovog ekstrakta niža samo za 9,8%.





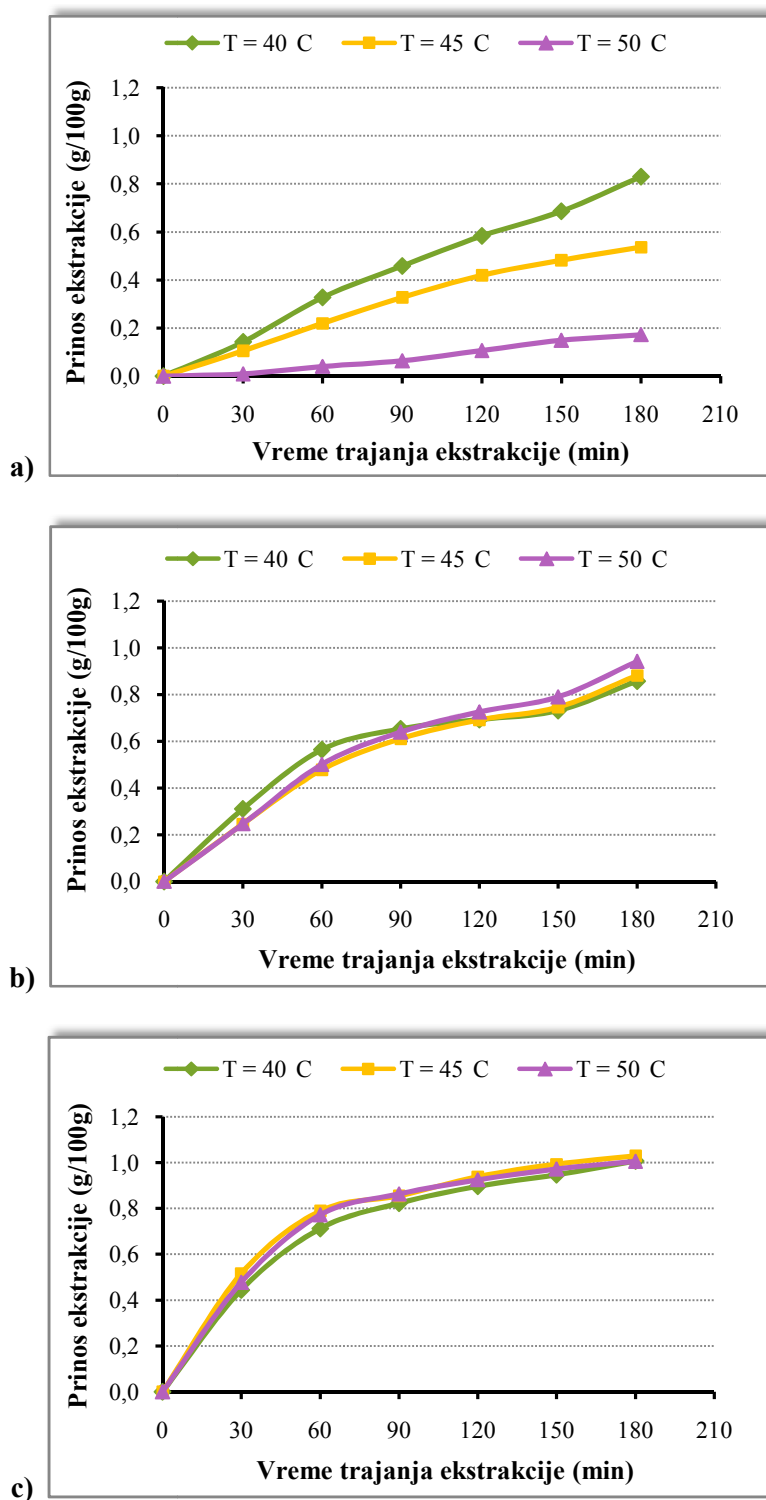
**Slika 76.** Uticaj pH vrednosti model vode i doze IV frakcije (dobijene ultrafiltracijom) na njenu koagulacionu aktivnost u model vodi početne mutnoće 220 NTU

#### **4.8. PREČIŠĆAVANJE PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA IZDVAJANJEM NEPOLARNIH KOMPONENTI SUPERKRITIČNOM EKSTRAKCIJOM SA CO<sub>2</sub>**

Prisustvo lipidnih materija u biljnom materijalu koji predstavlja potencijalni izvor koagulacionog sredstva može izazvati formiranje emulzije, čime se ometaju površinske reakcije koje predstavljaju osnov procesa koagulacije i flokulacije, pa se na taj način ometa i sam ovaj proces (Muyibi et al., 2002). Stoga, ukoliko se prirodni koagulanti žele ekstrahovati iz biljnog materijala koji sadrži veliku količinu lipidnih materija, kao što je recimo seme *Moringa oleifera-e*, te masne materije se moraju izdvojiti pre same ekstrakcije aktivnih koagulantnih materija postupkom delipidacije. Delipidacija se najčešće izvodi primenom organskih rastvarača, kao što je n-heksan. Kao što je već navedeno u poglavlju 2.3.9., sadržaj lipidnih materija u pasulju se kreće od 1 – 3%, u zavisnosti od sorte pasulja. Ovaj deo eksperimentalnog rada je imao za cilj da se iz zrna pasulja izdvoje masne materije pre ekstrakcije koagulanata, kako bi se proverilo da li njihovo prisustvo/odsustvo ima uticaja na kasniju koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja. Ekstrakcija lipidnih komponenata iz pasulja je izvedena ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju.

##### **4.8.1. Uticaj pritiska, temperature i vremena trajanja superkritične ekstrakcije pasulja na prinos ekstrakcije**

U ovom delu ispitivanja praćen je uticaj pritiska, temperature i vremena trajanja ekstrakcije na prinos ekstrahovanih materija. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 77.



**Slika 77.** Zavisnost prinosa ekstrakcije ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju od vremena trajanja ekstrakcije, na različitim temperaturama i na pritiscima:

a) 100 bar, b) 200 bar i c) 300 bar

Maksimalan prinos ekstrakcije pri pritisku od 100 bar i temperaturama 40°C, 45°C i 50°C (Slika 77a) se kreće u opsegu od 0,1729 – 0,8309 g/100 g uzorka. Nešto veći prinos ostvaren je pri pritisku 200 bar (Slika 77b), i kreće se od 0,8565 – 0,9422 g/100 g uzorka. Najveći prinos ekstrakcije postiže se pri pritisku od 300 bar (Slika 77c) i iznosi od 1,0054 – 1,0285 g/100 g uzorka.

Najmanji prinos ekstrakcije se ostvaruje primenom superkritičnog ugljen-dioksida na pritisku od 100 bar i temperaturi od 50°C. Najveći prinos ekstrakcije ostvaren je primenom superkritičnog ugljen-dioksida na temperaturi od 45°C i pritisku od 300 bar. Kod ekstrakcije primenom ugljen-dioksida u superkritičnom stanju na pritisku od 100 bar, prinos ekstrakcije raste značajno sa povećanjem vremena ekstrakcije i opada sa povećanjem temperature ekstrakcije. Primenom ugljen-dioksida u superkritičnom stanju na pritisku od 200 i 300 bar, prinos ekstrakcije pasulja značajno raste do vremena od oko 60 minuta, nakon čega je taj rast manje izražen. Pored toga, pri radu na 200 i 300 bar, uticaj temperature (u ispitivanom opsegu) na prinos ekstrakcije skoro da nema značaja, za razliku od slučaja kada se radi sa superkritičnim ugljen-dioksidom na 100 bar.

#### 4.8.2. Soxhlet ekstrakcija lipidnih komponenti

Određivanje količine preostalih lipidnih materija u biljnom materijalu nakon ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom (u iscrpljenom biljnom materijalu), izvedeno je Soxhlet ekstrakcijom i rezultati su prikazani u Tabeli 19, a na isti način je određena i ukupna količina lipidnih materija u netretiranom pasulju, i ona iznosi 1,44 g/100 g biljnog materijala.

**Tabela 19.** Količina lipidnih komponenti ekstrahovanih metodom po Soxhlet-u iz iscrpljenog pasulja (pasulja koji je prethodno bio podvrgnut ekstrakciji ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju)

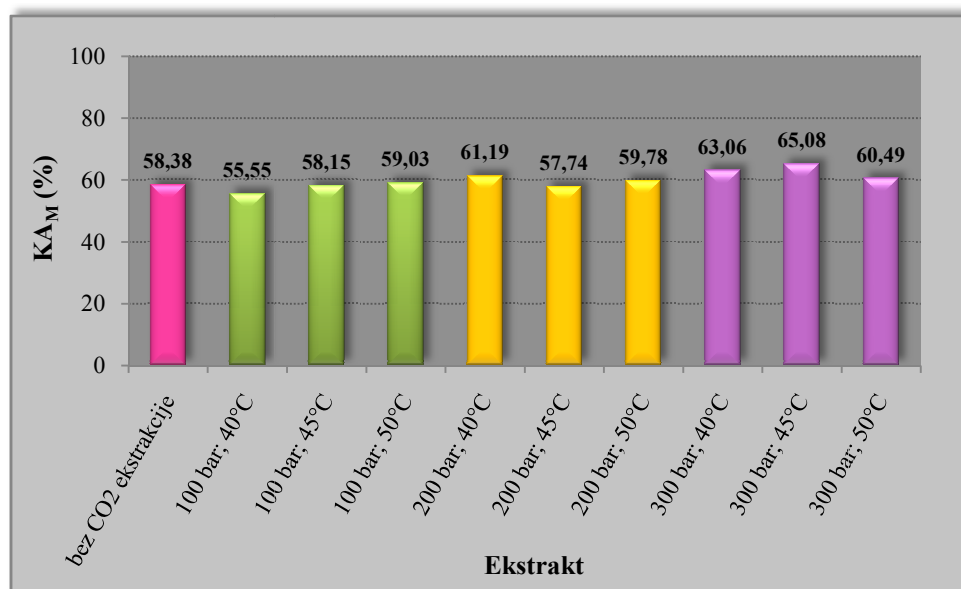
Pasulj iscrpljen na:		Količina ekstrahovanih lipidnih materija (g/100 g uzorka):
p (bar)	T (°C)	
100	40	0,58
100	45	0,82
100	50	1,22
200	40	0,52
200	45	0,50
200	50	0,47
300	40	0,34
300	45	0,40
300	50	0,37
Pasulj pre ekstrakcije sa CO <sub>2</sub>		1,44

Iz Tabele 19 se može primetiti da količina lipidnih komponenti ekstrahovanih iz pasulja nakon što su iz njega ove materije bile izdvajane ekstrakcijom ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju opada sa povećanjem radnog pritiska, što je u skladu sa rezultatima prikazanim na Slici 77.

#### 4.8.3. Koagulaciona aktivnost ekstraktata dobijenih ekstrakcijom iz iscrpljenog pasulja

Nakon izdvajanja nepolarnih materija ugljen-dioksidom u superkritičnom stanju, iz, na taj način iscrpljenog pasulja, su ekstrahovani koagulantni klasičnim postupkom ekstrakcije (opisanim u poglavlju 3.2.3.) sa destilovanom vodom i 0,5 mol/l rastvorom NaCl. Dobijeni ekstrakti su korišćeni kao koagulantni.

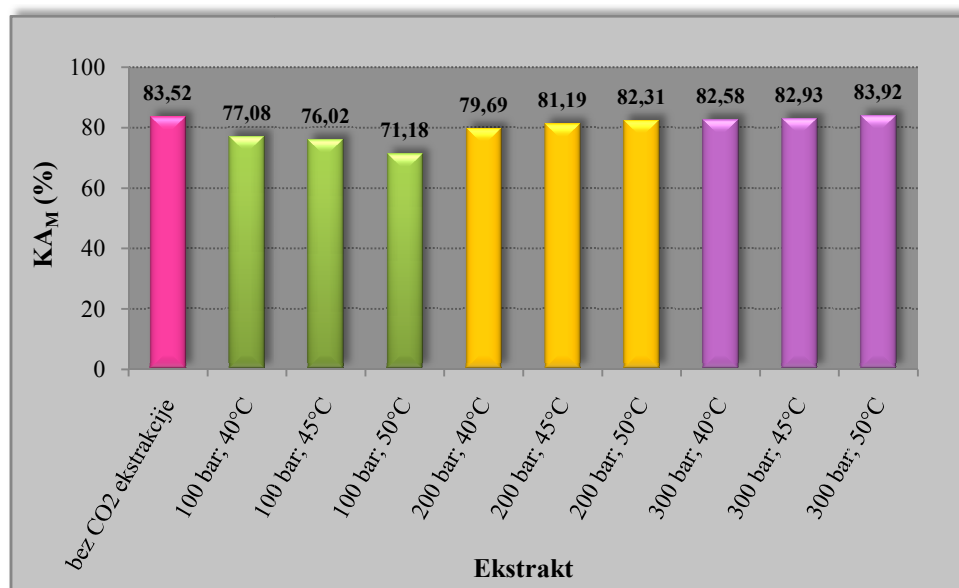
S obzirom na rezultate prikazane u poglavljima 4.5.6. i 4.5.7., vodeni ekstrakti su primenjeni u testovima koagulacije u model vodi početne mutnoće 200 NTU, pH vrednosti 6 i u dozi od 0,1 ml/l. Dobijene koagulacione aktivnosti za vodene ekstrakte dobijene iz pasulja nakon ekstrakcije ugljen-dioksidom u superkričnom stanju, pri različitim uslovima ekstrakcije, su prikazane na Slici 78. Na istom histogramu je prikazana i koagulaciona aktivnost ekstrakta dobijenog iz pasulja iz koga lipidne komponente nisu izdvojene ekstrakcijom sa ugljen-dioksidom.



**Slika 78.** Koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa destilovanom vodom iz pasulja iz koga su prethodno izdvojene lipidne materije ekstrakcijom sa ugljen-dioksidom u superkričnom stanju pri različitim pritiscima i temperaturama, kao i ekstrakta dobijenog ekstrakcijom iz netretiranog pasulja

Sa histograma na Slici 78 se vidi da najveću koagulacionu aktivnost pokazuje ekstrakt dobijen iz iscrpljenog pasulja nakon superkrične ekstrakcije na pritisku od 300 bar i temperaturi od 45°C, i ona iznosi 65,08%. Najnižu vrednost koagulacione aktivnosti od 55,55% ima ekstrakt iz iscrpljenog pasulja iz koga su prethodno nepolarne komponente ekstrahovane na pritisku od 100 bar i temperaturi od 40°C. Osnovni cilj izdvajanja nepolarnih komponenti pre ekstrakcije koagulanata iz pasulja je bio da se utvrdi da li će to imati uticaja na koagulacionu aktivnost kasnije ekstrahovanih koagulanata, pa se u tom smislu sa Slike 78 može primetiti da većina ekstrakata pokazuje neznatno povećanje koagulacione aktivnosti nakon izdvajanja nepolarnih materija iz pasulja u poređenju sa koagulacionom aktivnošću ekstrakta dobijenog ekstrakcijom iz netretiranog pasulja, koja iznosi 58,38%. Kada se uporede podaci iz Tabele 19 za količine ekstrahovanih lipidnih materija i sa Slike 78 za koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih ekstrakcijom iz odgovarajućih pasulja, primetno je da se ne može utvrditi jasna zavisnost između količine ekstrahovanih lipidnih komponenti i koagulacione aktivnosti.

Koagulaciona aktivnost NaCl-ekstrakata je određivana u model vodi početne mutnoće 200 NTU, pH vrednosti 6 i pri dozi od 0,4 ml/l (uslovi odabrani na osnovu rezultata eksperimenata prikazanih u poglavljima 4.5.6. i 4.5.7.). Dobijeni rezultati, kao i koagulaciona aktivnost ekstrakta dobijenog na isti način iz pasulja iz koga nisu prethodno izdvojene lipidne komponente (netretirani pasulj), su prikazani na Slici 79.



**Slika 79.** Koagulacione aktivnosti ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl iz pasulja iz koga su prethodno izdvojene lipidne materije ekstrakcijom sa ugljen-dioksidom u superkričnom stanju pri različitim pritiscima i temperaturama, kao i ekstrakta dobijenog ekstrakcijom iz netretiranog pasulja

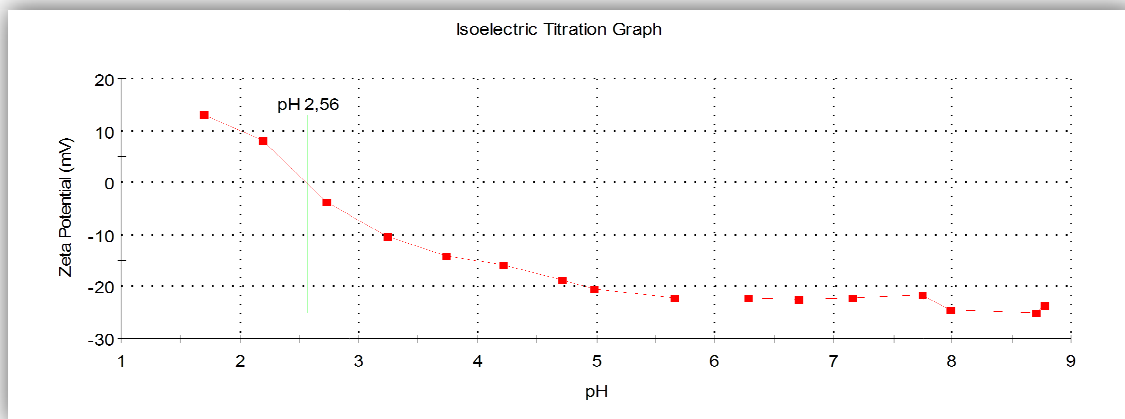
Maksimalnu koagulacionu aktivnost od 83,92% postiže ekstrakt dobijen iz iscrpljenog pasulja nakon ekstrakcije ugljen-dioksidom u superkričnom stanju na pritisku od 300 bar i temperaturi od 50°C. Ipak, koagulaciona aktivnost ovog ekstrakta je zanemarljivo viša od koagulacione aktivnosti ekstrakta dobijenog iz pasulja iz koga nisu izdvojene nepolarne komponente superkričnom ekstrakcijom. Najmanju koagulacionu aktivnost je imao ekstrakt iz iscrpljenog pasulja nakon superkrične ekstrakcije na pritisku od 100 bar i temperaturi od 50°C, i ona je iznosila 71,18%. Kod ekstrakata iz iscrpljenog pasulja dobijenog nakon superkrične ekstrakcije sa ugljen-dioksidom na pritiscima od 200 i 300 bar, primećuje se porast koagulacione aktivnosti sa povećanjem temperature na kojoj je izvođena ekstrakcija ugljen-dioksidom, dok je kod ekstrakata dobijenih iz pasulja nakon ekstrakcije ugljen-dioksidom u superkričnom stanju na 100 bar situacija obrnuta, tj. primećuje se pad koagulacione aktivnosti sa povećanjem temperature. U odnosu na koagulacionu aktivnost vodenih ekstrakata, koagulaciona aktivnost NaCl-ekstrakata je značajno veća, što ukazuje na pozitivan uticaj prisustva soli u ekstragensu.

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da izdvajanje nepolarnih materija iz zrna pasulja nema značajniji uticaj na efikasnost bistrenja ekstraktima koji se nakon toga dobijaju iz pasulja, što se može objasniti malim sadržajem lipida u ovoj sorti pasulja – 1,44%. Stoga, nije potreban korak delipidacije pre ekstrakcije kako bi se izdvojile lipidne materije, što svakako predstavlja prednost i sa ekonomskog i sa aspekta zaštite životne sredine u odnosu na neke druge izvore prirodnih koagulanata, kao što je *Moringa oleifera*.

#### 4.9. UTICAJ SADRŽAJA RAZLIČITIH JONA NA KOAGULACIONU AKTIVNOST PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA

Kako je ranije pomenuto, agregacija čestica u rastvoru se može odvijati prema četiri klasična mehanizma koagulacije: kompresija dvojnog električnog sloja, *sweep* flokulacija, adsorpcija i neutralizacija naelektrisanja i adsorpcija i povezivanje mostovima, a kod polimernih koagulanata generalno preovlađuju poslednja dva mehanizma delovanja.

Polimerni koagulanti mogu biti katjonski, anjonski ili nejonski. U poglavlju 4.6., na Slici 34 je prikazana zavisnost zeta potencijala sirovog ekstrakta pasulja od pH vrednosti, odakle se vidi da je izoelektrična tačka sirovog ekstrakta 3,61. U okviru rada je takođe ispitan i zeta potencijal suspenzije kaolina koja je korišćena za pripremu model vode u zavisnosti od pH. Dobijena zavisnost je prikazana na Slici 80, sa koje se vidi da je izoelektrična tačka suspenzije kaolina na pH vrednosti 2,56.

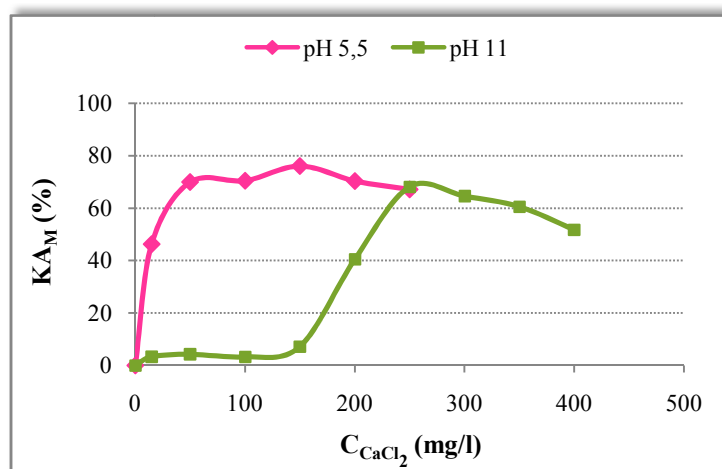


**Slika 80.** Zavisnost zeta potencijala u suspenziji kaolina od pH vrednosti

S obzirom na ovakve vrednosti izoelektričnih tački, jasno je da će i koagulant i čestice mutnoće u model vodi (čestice kaolina) na radnim pH vrednostima biti negativno naelektrisani, pa time definitivno neće moći da dođe do obrazovanja flokula i koagulacije. U eksperimentima čiji su rezultati prethodno prikazani, model voda je pripremana sa vodovodskom vodom, pa je pretpostavka da su joni  $\text{Ca}^{2+}$ , prisutni u vodovodskoj vodi, u tom slučaju služili kao veza između negativno naelektrisanih čestica, i omogućavali da dođe do koagulacije. Da bi se ova hipoteza proverila, u narednoj grupi eksperimenata model voda je pripremana sa destilovanom vodom. Početna mutnoća model vode je podešena na 220 NTU, a eksperimenti su izvođeni na dve pH vrednosti – pH 5,5 i pH 11 (pH 5,5 je izabran na osnovu rezultata eksperimenata prikazanih u poglavlju 4.7., a pH 11 kako bi se proverilo na koji način izdvajanje hidroksida metala na ovoj pH vrednosti utiče na koagulacionu aktivnost). U tako pripremljenu model vodu su dodavane različite količine soli  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , i  $\text{NaCl}$ , a zatim izvedeni testovi koagulacije, pri čemu je doza sirovog ekstrakta (dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom  $\text{NaCl}$  pri ekstrakcionom odnosu 1:20) u svim testovima iznosila 0,4 ml/l. U testovima je praćena zavisnost koagulacione aktivnosti od koncentracije odgovarajuće soli.

Na Slici 81 je prikazana zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije  $\text{CaCl}_2$ . Prvo što se uočava sa grafika je to da na obe pH vrednosti pri koncentraciji  $\text{CaCl}_2$  0 mg/l nema koagulacione aktivnosti, i da se ona javlja kako počinje da raste sadržaj  $\text{Ca}^{2+}$  jona. Ovo navodi na zaključak da su  $\text{Ca}^{2+}$  joni od suštinske važnosti za formiranje flokula, što je i bila pretpostavka na osnovu rezultata ispitivanja zeta potencijala suspenzije kaolina i sirovog ekstrakta pasulja. Naime, zeta potencijal suspenzije kaolina iznosi 0 mV (izoelektrična tačka) na pH vrednosti 2,56, a sirovog ekstrakta pasulja na pH vrednosti 3,61. S obzirom na ovakve izoelektrične tačke, na obe ispitivane pH vrednosti (5,5 i 11) i čestice kaolina i prirodni koagulanti iz ekstrakta će biti negativno naelektrisani, pa će dolaziti do njihovog međusobnog odbijanja, odnosno biće potreban posrednik koji je pozitivno naelektrisan da bi došlo do formiranja flokula. U ovom slučaju rezultati pokazuju da je upravo  $\text{Ca}^{2+}$  jon taj posrednik, i on može delovati na dva načina: može igrati ulogu

posrednika između negativno naelektrisanih molekula koagulanta i negativno naelektrisanih čestica kaolina, ili ulogu posrednika između samih negativno naelektrisanih molekula koagulanta, pri čemu će se graditi mrežasta struktura u koju će se hvatati suspendovane čestice kaolina.



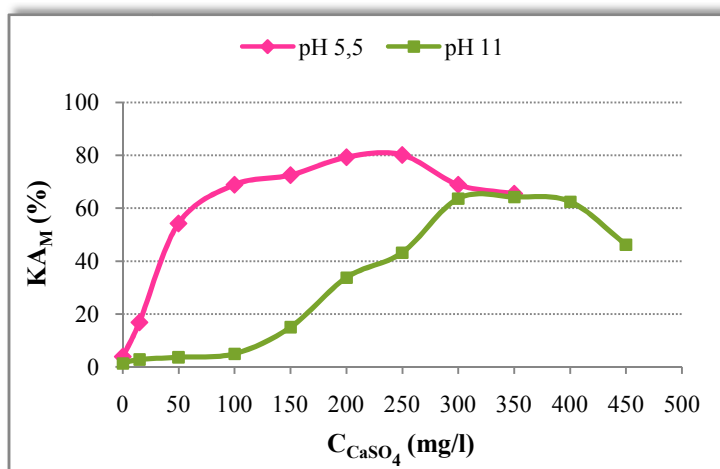
Slika 81. Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije  $CaCl_2$  na pH 5,5 i pH 11

Sa grafika se takođe može videti da koagulaciona aktivnost ekstrakta na pH 5,5 na početku naglo raste sa povećanjem sadržaja  $CaCl_2$ , i nastavlja sa rastom sve do dostizanja maksimuma od 76% pri koncentraciji  $CaCl_2$  od 150 mg/l, a zatim se uočava njen pad. Za razliku od pH 5,5, na pH 11 je potrebna mnogo veća koncentracija iste soli da bi došlo do značajnijeg povećanja koagulacione aktivnosti, tj. sve do koncentracije  $CaCl_2$  od 150 mg/l koagulaciona aktivnost se skoro ne menja sa dodatkom soli i kreće se oko veoma niske vrednosti od oko 5%. Potencijalno objašnjenje za ovakvo ponašanje se može potražiti u činjenici da na ovako visokoj pH vrednosti može doći do brzog izdvajanja  $Ca(OH)_2$ , odnosno joni  $Ca^{2+}$  se u tom slučaju troše na ovu reakciju pa se ne mogu ugraditi u mrežastu strukturu i omogućiti formiranje flokula. Tek kada je koncentracija  $CaCl_2$  takva da nakon utroška jona kalcijuma za formiranje kalcijum-hidroksida preostaje i neka količina tih jona za formiranje mrežaste strukture, tj. flokula, javlja se koagulaciona aktivnost. U ovom slučaju pri koncentraciji  $CaCl_2$  većoj od 150 mg/l koagulaciona aktivnost naglo raste sa dodatkom soli, sve do postizanja maksimuma od 68,2%, pri koncentraciji soli od 250 mg/l, nakon čega se sa daljim dodatkom soli uočava pad efikasnosti bistrenja.

Do pada koagulacione aktivnosti nakon dostizanja maksimalne vrednosti (pri optimalnoj koncentraciji  $Ca^{2+}$  jona, odnosno soli  $CaCl_2$ ) i u jednom i u drugom slučaju dolazi usled toga što zbog velike koncentracije  $Ca^{2+}$  jona u odnosu na koncentraciju prirodnog koagulanta dolazi do prepokrivanja (zaposjedanja) površine koagulanta  $Ca^{2+}$  jonima, a zatim i do nepotpunog formiranja mrežaste strukture ili/i međusobnog odbijanja tako preopkrivenih molekula koagulanta usled istoimenog naelektrisanja, tj inverzije naelektrisanja (Bolto and Gregory, 2007).

Što se tiče izbora pogodnije pH vrednosti, vidi se da je u ovom slučaju povoljnije raditi na pH 5,5. Na ovoj pH vrednosti maksimalna koagulaciona aktivnost se postiže pri koncentraciji  $CaCl_2$  od 150 mg/l, dok na pH 11 pri ovoj koncentraciji soli koagulaciona aktivnost tek počinje da raste. Potrebna je skoro duplo veća koncentracija  $CaCl_2$  da bi se postigla maksimalna koagulaciona aktivnost na pH 11, i ona je i u tom slučaju niža od maksimuma koji se može postići na pH 5,5.

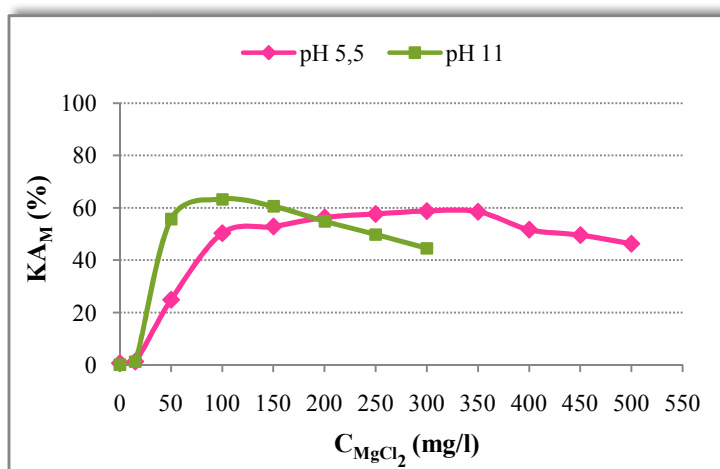
Nakon uticaja sadržaja  $\text{CaCl}_2$  na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja, ispitan je i uticaj sadržaja druge soli kalcijuma,  $\text{CaSO}_4$ , na koagulacionu aktivnost ovog ekstrakta, na dve različite pH vrednosti (pH 5,5 i pH 11). Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 82.



**Slika 82.** Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije  $\text{CaSO}_4$  na pH 5,5 i pH 11

I u ovom slučaju se može videti (Slika 82) da, ukoliko nema dodate soli, ne postoji ni koagulaciona aktivnost ekstrakta. Kao i u prethodnom slučaju, kada je kao so korišćen kalcijum-hlorid, i ovde se primećuje slično ponašanje, s tom razlikom da su maksimumi koagulacione aktivnosti pomereni ka većim vrednostima koncentracije soli. Koagulaciona aktivnost naglo raste već pri malim koncentracijama  $\text{CaSO}_4$ , sa maksimumom od 80,2% pri koncentraciji soli od 250 mg/l na pH 5,5, dok je na pH 11 potrebna mnogo veća koncentracija soli da bi došlo do javljanja značajnije koagulacione aktivnosti, koja dostiže maksimum od 64,2% pri koncentraciji soli od 350 mg/l. Pomeranje maksimuma koagulacione aktivnosti ka većem sadržaju soli u ovom slučaju u odnosu na prethodno ispitivanje, kada je primenjen  $\text{CaCl}_2$ , se može pripisati različitom udelu jona kalcijuma u ove dve soli.

S obzirom na to da je i magnezijum dvovalentan jon, pretpostavka je da i on ima uticaj na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja. Stoga je u sledećim eksperimentima ispitivan uticaj sadržaja  $\text{MgCl}_2$  i  $\text{MgSO}_4$  na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja. Na Slici 83 je prikazana zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije  $\text{MgCl}_2$ .

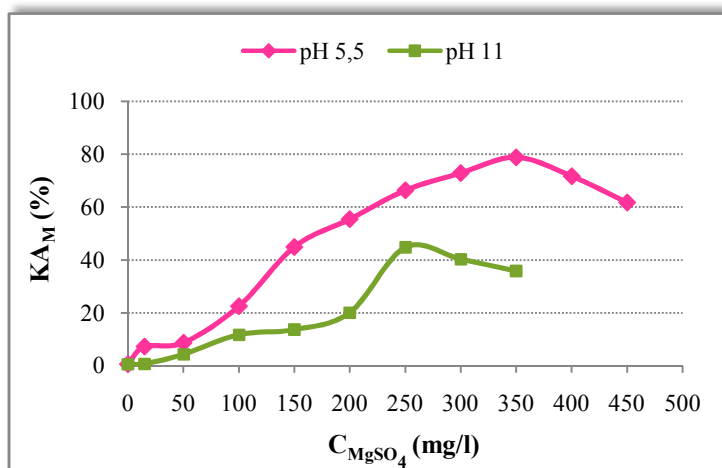


**Slika 83.** Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije  $\text{MgCl}_2$  na pH 5,5 i pH 11



Kada se sagledaju rezultati prikazani na Slici 83, može se uočiti da je ponašanje primenjenog ekstrakta u pogledu koagulacione aktivnosti pri dodatku  $MgCl_2$  različito u odnosu na trend koji je u tom smislu postojao kada su dodavane soli kalcijuma. U ovom slučaju pH 11 se pokazao kao pogodniji u odnosu na pH 5,5 (kod soli kalcijuma je bilo obrnuto), jer se na ovoj pH vrednosti maksimalna koagulaciona aktivnost (63,3%) postiže pri koncentraciji soli od 100 mg/l, dok je maksimalna koagulaciona aktivnost na pH 5,5 iznosila 58,7%, pri koncentraciji soli od 300 mg/l.

Na grafiku na Slici 84 je prikazana koagulaciona aktivnost ekstrakta pasulja na pH 5,5 i pH 11 u zavisnosti od sadržaja magnezijum-sulfata.

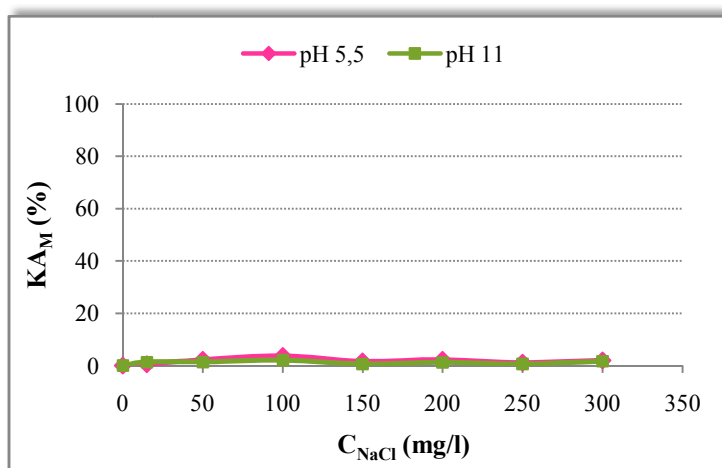


Slika 84. Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije  $MgSO_4$  na pH 5,5 i pH 11

Može se primetiti da se prilikom dodatka  $MgSO_4$  na pH 5,5 postiže značajno veća efikasnost uklanjanja mutnoće nego na pH 11. Koagulaciona aktivnost na pH 5,5 dostiže svoj maksimum od 78,8% pri koncentraciji soli od 350 mg/l, dok je ona na pH 11 skoro duplo niža (44,7%), pri koncentraciji soli od 250 mg/l. Trend koagulacione aktivnosti prilikom primene  $MgSO_4$  je dosta različit u odnosu na trend kod primene  $MgCl_2$ , a sličniji je ponašanju koagulacione aktivnosti kod primene  $CaCl_2$  i  $CaSO_4$ .

S obzirom da je na početku ovog poglavlja postavljena hipoteza da samo viševalentni katjoni mogu doprineti formiranju flokula, s namerom da se ta hipoteza i proveriti ispitan je i uticaj sadržaja NaCl na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 85.

Sa grafika na Slici 85 se vidi da sadržaj NaCl ne utiče na koagulacionu aktivnost ekstrakta pasulja, odnosno da je koagulaciona aktivnost neznatna, tj. može se smatrati greškom merenja. Ovakvi rezultati su još jednom potvrdili hipotezu da jednovalentni katjoni ne mogu učestvovati u formiranju flokula, jer mogu ostvariti samo jednu vezu – ili sa česticom kaolina ili sa koagulantom, što je nedovoljno za izgradnju flokula, tj. da katjoni trebaju biti barem dvovalentni da bi mogli uticati na koagulacionu aktivnost.



Slika 85. Zavisnost koagulacione aktivnosti ekstrakta pasulja od koncentracije NaCl na pH 5,5 i pH 11

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da su dominantni koagulant u ekstraktu pasulja anjonski polielektroliti. Destabilizacija negativno naelektrisanih čestica kaolina se može odigrati samo uz dodatak viševalentnih katjona, kada oni služe za obrazovanje veza bilo između negativno naelektrisanih molekula koagulanta i negativno naelektrisanih čestica, pa se koagulacija odvija po mehanizmu povezivanja mostovima, bilo između samih negativno naelektrisanih molekula koagulanta, kada se obrazuje mrežasta struktura u koju se „hvataju“ čestice kaolina, pa se koagulacija odvija po mehanizmu *sweep* koagulacije. Od prirodnih koagulanata izolovanih iz biljaka koji se pominju u literaturi, po mehanizmu povezivanja čestica mostovima deluju ekstrakt semena nirmali drveta (Yin, 2010), ekstrakt semenki grožđa (Jeon et al., 2009) i materije ekstrahovane iz kaktusa *Opuntia* spp. (Miller et al., 2008), i svi su anjonski koagulant kao i ekstrakt pasulja, dok ekstrakt *M. oleifera*-e koji je katjonski koagulant deluje po mehanizmu neutralizacije naelektrisanja (Ndabigengesere et al., 1995). Sličnost između ekstrakta pasulja i ekstrakta *M. oleifera*-e se ogleda u tome što i aktivne materije u ekstraktu *M. oleifera*-e dobijenim ekstrakcijom sa rastvorom NaCl mogu da obrazuju mrežastu strukturu u prisustvu dvovalentnih katjona (Okuda et al., 2001a), i tada deluju po mehanizmu *sweep* koagulacije, a u prisustvu jednovalentnih katjona imaju zanemarljivu koagulacionu aktivnost.

#### 4.10. UTICAJ PRIRODNIH KOAGULANATA IZ ZRNA PASULJA NA SADRŽAJ ORGANSKIH MATERIJA U OBRADENOJ VODI

S obzirom na to da su prirodni koagulant organskog porekla, oni mogu povećati sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi, što može voditi povećanom razvoju mikroorganizama. Pored toga, prilikom dezinfekcije vode hlorom u postrojenjima za pripremu vode, trošice se dodatne količine hlora na oksidaciju ovih organskih materija, i pri tome mogu nastati veoma toksični nusproizvodi dezinfekcije. Stoga je, pored utvrđivanja njihove koagulacione aktivnosti, potrebno ispitati i njihov uticaj na sadržaj organskih materija u izbistrenoj vodi, nakon koagulacije i flokulacije. U ovom delu ispitivanja u okviru teze, kao koagulant su primenjeni različiti sirovi ekstrakti pasulja, kao i različite frakcije ovih ekstrakata dobijene raznim postupcima prečišćavanja sirovih ekstrakata, a koji su razmotreni u prethodnim poglavljima ovog rada. Radi boljeg pregleda, izvedeni eksperimenti su podeljeni u tri grupe prema primenjenom koagulantu:

- I) U prvoj grupi eksperimenata korišćen je sirovi ekstrakt dobijen ekstrakcijom iz samlevenog zrna pasulja destilovanom vodom, pri odnosu polazne sirovine i ekstragensa 1:20, i koji je zatim podvrgnut frakcionisanju ultrafiltracijom kao što je objašnjeno u poglavlju 3.2.2. Kako su za ultrafiltraciju korišćene tri membrane različitog *cut off*-a (5000 Da, 10000 Da i 30000 Da), dobijene su četiri frakcije u kojima su se nalazili molekuli različitih molekulskih masa. Efikasnost koagulacije polaznog sirovog ekstrakta i ove četiri frakcije je praćena preko testova koagulacije. Dakle, primenjeni koagulant u prvoj grupi eksperimenata su:
1. Sirovi (neprečišćeni) ekstrakt zrna pasulja (dobijen ekstrakcijom sa vodom),
  2. I frakcija sa česticama molekulske mase < 5000 Da,
  3. II frakcija sa česticama molekulske mase 5000 Da – 10000 Da,
  4. III frakcija sa česticama molekulske mase 10000 Da – 30000 Da, i
  5. IV frakcija sa česticama molekulske mase > 30000 Da.
- II) U drugoj grupi eksperimenata kao koagulant su korišćeni sirovi ekstrakti pokožice, oljuštenog zrna (jezgra) i celog zrna pasulja, dobijeni ekstrakcijom iz samlevenog materijala sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl, pri odnosu polazne sirovine i ekstragensa 1:100:
1. Sirovi ekstrakt pokožice zrna pasulja (0,5 mol/l NaCl),
  2. Sirovi ekstrakt oljuštenog zrna (jezgra) pasulja (0,5 mol/l NaCl), i
  3. Sirovi ekstrakt celog zrna pasulja (0,5 mol/l NaCl).
- III) U trećoj grupi eksperimenata, korišćen je sirovi ekstrakt pasulja dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l NaCl, pri odnosu polazne sirovine i ekstragensa 1:20. Iz ovog sirovog ekstrakta su izolovanjem izdvojeni proteini (dodatkom amonijum-sulfata do 80% zasićenja). Supernatant je odvojen od taloga centrifugiranjem, a talog je zatim podvrgnut dijalizi naspram dejonizovane vode kako bi se izvela desaltacija. Dijalizat je zatim prečišćavan kolonskom hromatografijom na jonoizmenjivaču Amberlite™ IRA 900Cl, pri čemu je, nakon optimizacije eluiranja, stupnjevitim eluiranjem dobijeno šest frakcija protina (Poglavlje 4.6.4., Tabela 12). U trećoj grupi eksperimenata su primenjeni sledeći koagulant:
1. Sirovi ekstrakt zrna pasulja (0,5 mol/l NaCl),
  2. Supernatant izdvojen nakon taloženja proteina,
  3. Dijalizat nakon uklanjanja jona soli iz taloga,
  4. I frakcija (eluirana sa 0,5 mol/l NaCl),
  5. II frakcija (eluirana sa 0,78 mol/l NaCl),
  6. III frakcija (eluirana sa 0,86 mol/l NaCl),
  7. IV frakcija (eluirana sa 1,14 mol/l NaCl),
  8. V frakcija (eluirana sa 1,21 mol/l NaCl), i
  9. VI frakcija (eluirana sa 1,3 mol/l NaCl).

Testovi koagulacije za sirovi ekstrakt pasulja, I, II i III frakciju iz I grupe koagulanata su izvedeni u model vodi početne mutnoće 220 NTU, pH vrednosti 5,5, a doza koagulanata je iznosila 0,4 ml/l, dok su testovi koagulacije za IV frakciju iz I grupe koagulanata izvedeni u

istoj model vodi, ali sa dozom koagulantata od 0,9 ml/l (ove vrednosti su izabrane na osnovu rezultata eksperimenata prikazanih u poglavlju 4.7.). Testovi koagulacije za koagulanata iz II grupe i za sirovi ekstrakt pasulja, dijalizat i supernatant iz III grupe su izvedeni u model vodi početne mutnoće 220 NTU, pH vrednosti 6, a doza koagulanata je iznosila 0,4 ml/l. Testovi koagulacije sa šest frakcija iz III grupe eksperimenata kao koagulantima su izvedeni u model vodi početne mutnoće 200 NTU, pH vrednosti 9 (prvobitno su i ovi testovi koagulacije urađeni u model vodi početne mutnoće 200 NTU i pH vrednosti 6, ali nije se mogla uočiti koagulaciona aktivnost) i pri onoj dozi svake od frakcija koja daje maksimalnu koagulacionu aktivnost u smislu uklanjanja mutnoće, a koje su ranije utvrđene (Slika 72) (za: I frakciju 5 ml/l, II frakciju 4 ml/l, III frakciju 5 ml/l, IV frakciju 5 ml/l, V frakciju 5 ml/l i VI frakciju 7 ml/l). Koagulaciona aktivnost je praćena na dva načina: preko mutnoće ( $KA_M$ ) i preko permanganatnog broja model vode ( $KA_{PB}$ ), kao pokazatelja sadržaja organskih materija. Dobijene  $KA_M$  i  $KA_{PB}$  vrednosti za ispitivane prirodne koagulanata su date u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Koagulacione aktivnosti prirodnih koagulanata izolovanih iz pasulja, izražene preko mutnoće ( $KA_M$ ) i permanganatnog broja model vode ( $KA_{PB}$ )

Grupa eksperimenata	Koagulant	$KA_M$ (%)	$KA_{PB}$ (%)
I	Sirovi ekstrakt pasulja (vodeni)	88,50	-66,05
	I frakcija (M<5000 Da)	18,88	-18,05
	II frakcija (5000<M<10000 Da)	19,51	-21,99
	III frakcija (10000<M<30000 Da)	43,24	-18,05
	IV frakcija (M>30000 Da)	79,80	-16,04
II	Sirovi ekstrakt pokožice pasulja (0,5 mol/l NaCl)	21,30	-17,30
	Sirovi ekstrakt oljuštenog zrna (jezgra) pasulja (0,5 mol/l NaCl)	78,28	-46,19
	Sirovi ekstrakt celog zrna pasulja (0,5 mol/l NaCl)	56,98	-53,81
III	Sirovi ekstrakt pasulja (0,5 mol/l NaCl)	78,65	-53,87
	Dijalizat	80,59	-11,56
	Supernatant	75,77	-50,06
	I frakcija	88,60	68,40
	II frakcija	87,20	71,60
	III frakcija	80,90	70,50
	IV frakcija	81,20	65,30
	V frakcija	82,60	66,30
VI frakcija	85,50	67,40	

Prvo što se uočava iz gore prikazanih rezultata je to da su u većini slučajeva vrednosti za  $KA_{PB}$  negativne, što znači da je primenom datih koagulanata došlo do povećanja sadržaja organskih materija u tretiranoj vodi u odnosu na slepu probu.

Kada se pogledaju  $KA_M$  vrednosti za koagulanate I grupe eksperimenata, uočava se da I i II, pa čak i III frakcija pokazuju nisku koagulacionu aktivnost u smislu uklanjanja mutnoće, dok IV frakcija i sirovi ekstrakt imaju visoku i približno jednaku aktivnost, što vodi zaključku da dominantnu koagulacionu aktivnost u sirovom ekstraktu imaju molekuli čije su molekulske mase preko 30000 Da (koji zaostaju u IV frakciji), dok molekuli manjih molekulskih masa ne poseduju značajniju sposobnost uklanjanja čestica mutnoće. Sa druge strane, obrada vode sirovim vodenim ekstraktom dovodi do najvećeg porasta sadržaja organskih materija. I, II i III frakcija doprinose povećanju sadržaja organskih materija u maloj meri, ali ipak ove frakcije nisu od značaja, jer su pokazale veoma slabo uklanjanje mutnoće. Najmanji porast sadržaja organskih materija je ostvaren primenom IV frakcije, koja istovremeno pokazuje visoku efikasnost smanjenja mutnoće vode, pa se može reći da je primena ove frakcije pogodna i sa aspekta koagulacione aktivnosti i sa aspekta uticaja na sadržaj organskih materija u vodi nakon koagulacije.

U II grupi eksperimenata, najveću koagulacionu aktivnost u smislu uklanjanja mutnoće je postigao sirovi ekstrakt jezgra, a najmanju sirovi ekstrakt pokožice zrna pasulja. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da materije iz pokožice na neki način ometaju koagulacionu aktivnost materija iz jezgra, s obzirom na to da je koagulaciona aktivnost ekstrakta dobijenog iz celog zrna dosta niža (za 22%) od koagulacione aktivnosti ekstrakta dobijenog samo iz jezgra. Najbolji rezultat, što se tiče sadržaja organskih materija, je postignut nakon primene sirovog ekstrakta pokožice, što ni u ovom slučaju nije od značaja zbog pomenute niske koagulacione aktivnosti ovog ekstrakta. Poređenjem  $KA_M$  i  $KA_{PB}$  vrednosti sirovih ekstrakata celog i oljuštenog zrna, može se zaključiti da uklanjanje pokožice pozitivno utiče na koagulacionu aktivnost, dok je povećanje sadržaja organskih materija u obrađenoj vodi samo donekle umanjeno njenim uklanjanjem.

Koagulantni iz III grupe eksperimenata su generalno pokazali visoku koagulacionu aktivnost. Unutar same grupe, najveća efikasnost je postignuta primenom I i II frakcije (88,6% i 87,2%), mada su i ostale frakcije imale sličnu aktivnost. Dijalizat čijim su prečišćavanjem kolonskom jonoizmenjivačkom hromatografijom dobijene frakcije je takođe postigao aktivnost oko 80%. Dijalizat sadrži istaložene proteine, pa njegova koagulaciona aktivnost potvrđuje pretpostvku da su proteini u ekstraktu pasulja aktivni koagulantni. Međutim, kako je i supernatant pokazao visoku koagulacionu aktivnost, može se zaključiti da i neke druge materije, neproteinske prirode, koje su prisutne u ekstraktu iz zrna pasulja imaju koagulacionu sposobnost. S obzirom na rezultate analize ekstrakata, prikazane u poglavlju 4.2. (ekstrakt pasulja sadrži visok procenat ugljenih hidrata, od kojih najveći deo čini skrob), i na literaturne podatke koji govore u prilog koagulacione aktivnosti ugljenih hidrata (Adinolfi et al., 1994; Miller et al., 2008; Yin, 2010) i među njima skroba (Pal et al., 2005), može se pretpostaviti da upravo oni daju visoku koagulacionu aktivnost supernatantu. Takođe, pasulj sadrži izvestan procenat rastvorljivih vlakana (pektin, gume i neke hemiceluloze), čiji je čest konstituent galakturonska kiselina u svom polimerizovanom obliku, tj. kao poligalakturonska kiselina, a ona se smatra visoko aktivnom u smislu koagulacije/flokulacije (Miller et al., 2008). U pogledu uticaja na sadržaj organskih materija, sirovi ekstrakt i supernatant su doveli do gotovo istog povećanja od oko 50%, dok se nakon primene dijalizata sadržaj organskih materija nije značajnije povećao. S druge strane, svih šest frakcija su dovele do značajnog (oko 70%) smanjenja sadržaja organskih materija u tretiranoj vodi. Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti da se prečišćavanjem sirovog ekstrakta metodom isaljavanja proteina poboljšava njegova koagulaciona aktivnost, a problem velikog povećanja sadržaja organskih materija nakon koagulacije, uveliko prevazilazi. Daljim prečišćavanjem proteina iz dijalizata njihovim fracionisanjem jonoizmenjivačkom hromatografijom dobijaju se

prečišćene frakcije koje zadržavaju odličnu koagulacionu aktivnost i ne povećavaju sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi, već ga, naprotiv, značajno snižavaju.

Iz prikazanih rezultata je jasno da se najpovoljniji odnos  $K_{AM}/K_{APB}$  postiže sa svih šest frakcija dobijenih prečišćavanjem dijalizata jonoizmenjivačkom hromatografijom. Takođe, dosta dobar odnos  $K_{AM}/K_{APB}$  se postiže sa IV frakcijom dobijenom ultrafiltracijom sirovog ekstrakta i dijalizatom kao koagulantima. Ovi koagulanti u velikoj meri smanjuju mutnoću vode, a pri tome se sadržaj organskih materija ne povećava značajnije. Na osnovu svega se može zaključiti da se od navedenih metoda prečišćavanja najbolji rezultati postižu:

- a) taloženjem proteina izolovanjem, dijalizom taloga i zatim frakcionisanjem proteina dijalizata jonoizmenjivačkom hromatografijom,
- b) taloženjem proteina izolovanjem i zatim dijalizom taloga i
- c) ultrafiltracijom na membrani sa MWCO vrednošću 30000 Da.

Sve ostale metode prečišćavanja i frakcionisanja nisu dale dovoljno dobre rezultate, bilo sa stanovišta uklanjanja mutnoće, bilo sa stanovišta uticaja na sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi. Jasno je da se daleko najbolji rezultati postižu kombinacijom metoda prečišćavanja pod a), međutim ovaj postupak može biti skup za pripremu većih količina prirodnih koagulanata, te stoga treba uzeti u obzir i metode pod b) i c) kao opcije za prečišćavanje. Što se tiče ove dve metode, nešto bolji rezultati se postižu taloženjem proteina i dijalizom taloga, ali ne sme se smetnuti s uma da se taloženje izvodi dodatkom značajne količine amonijum-sulfata, koji se zatim iz taloga uklanja dijalizom. Kod pripreme većih količina koagulanta to može biti nepoželjno sa ekološke strane. Dakle, može se zaključiti da je prečišćavanje sirovog ekstrakta svakako poželjno kao korak u pripremi prirodnog koagulanta dobijenog iz zrna pasulja, ali za konačan izbor metode prečišćavanja potrebno je uraditi detaljnu analizu predloženih postupaka, kako sa ekonomskog, tako i sa ekološkog stanovišta.

#### **4.11. PRIMENA EKSTRAKTA PASULJA ZA OBRADU RAZLIČITIH OTPADNIH VODA**

S obzirom na to da je efikasnost prirodnih koagulanata ekstrahovanih iz zrna pasulja u prethodnim eksperimentima ispitivana u model vodi, u ovom delu rada se želela ispitati njihova efikasnost i mogućnost primene za obradu realnih otpadnih voda kao znatno kompleksnijih sistema u odnosu na model vodu. U tom smislu su laboratorijski (prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.4.) pripremljene otpadne vode od proizvodnje bioetanola fermentacijom na različitim hranljivim podlogama. Rezultati dobijeni primenom prirodnih koagulanata iz zrna pasulja su upoređeni sa rezultatima obrade ovih otpadnih voda centrifugiranjem.

U okviru eksperimenata sirovi ekstrakt pasulja, dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri odnosu polazna sirovina : ekstragens 1:100, je primenjen kao koagulant u testovima koagulacije na četiri otpadne vode iz proizvodnje bioetanola: otpadna voda koja zaostaje nakon proizvodnje bioetanola fermentacijom na ekstrakcionom soku šećerne repe (ESOV), otpadna voda koja zaostaje nakon proizvodnje bioetanola fermentacijom na retkom soku šećerne repe (RSOV), otpadna voda koja zaostaje nakon proizvodnje bioetanola fermentacijom na gustom soku šećerne repe (GSOV) i otpadna voda koja zaostaje nakon proizvodnje bioetanola fermentacijom na melasi (MOV). S obzirom da se u zavisnosti od medijuma koji je primenjen za fermentaciono dobijanje bioetanola radi o četiri različite

otpadne vode, prvi korak je bio da se ove otpadne vode analiziraju. Rezultati njihove analize su prikazani u Tabeli 21.

**Tabela 21.** Rezultati analize otpadnih voda dobijenih nakon proizvodnje bioetanola na različitim podlogama

Parametar:	Otpadna voda:			
	ESOV	RSOV	GSOV	MOV
pH	4,23	4,40	4,24	5,40
Suva materija (mg/l)	34 543	28 258	32 132	109 078
Pepeo (mg/l)	5 052	3 994	4 140	26 946
Organska suva materija (mg/l)	29 491	24 264	27 992	82 132
% organske suve materije	85,37	85,86	87,11	75,30
Suspendovane materije (mg/l)	12 550	8 698	9 215	10 164
Lako taložive materije (ml/l)	31,7	8,5	2,1	n.o.*
Ukupni azot po Kjeldahl-u (mg/l)	1 326	1 015	983	5 675
HPK (mg O <sub>2</sub> /l)	66 850	60 730	96 960	126 170
BPK <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	41 000	12 000	26 700	23 800
(BPK <sub>5</sub> /HPK)x100 (%)	61,33	19,76	27,54	18,86
Permanganatni broj (mg KMnO <sub>4</sub> /l)	53 190	37 800	51 510	92 900

\*nije određeno

Kao što se iz rezultata prikazanih u Tabeli 21 može videti, sadržaj organskih materija je veoma visok u sve četiri otpadne vode, kao i sadržaj suspendovanih materija i ukupnog azota. U poređenju sa ostale tri otpadne vode, melasna otpadna voda se značajno razlikovala – suva materija, HPK i svi ostali parametri su kod ove otpadne vode bili viši, a objašnjenje za to je dosta drugačiji sastav melase u odnosu na ostala tri supstrata korišćena za dobijanje bioetanola.

Otpadna voda od ekstrakcionog soka je bila zagađenija od otpadnih voda od retkog i gustog soka. Poznato je iz tehnologije dobijanja šećera da se ekstrakcioni sok prečišćava taloženjem balastnih materija, i na taj način nastaje retki sok. Proizvodni mikroorganizam za dobijanje bioetanola (*Saccharomyces cerevisiae*) asimiluje uglavnom glukozu, dok ne može da usvoji mnoge od materija koje se nalaze u ekstrakcionom soku, a nisu prisutne u retkom i gustom soku, pa se one pojavljuju kao zagađenje u džibri, čineći njen BPK<sub>5</sub> znatno višim nego što je on u ostalim džibrama. Kao što se iz Tabele 21 vidi, sadržaj lako taloživih materija je značajno viši u otpadnoj vodi od ekstrakcionog soka u poređenju sa ostalim otpadnim vodama. Ove lako taložive materije se uglavnom sastoje od peska i mulja – čestica koje doprinose koagulaciji. Sadržaj suspendovanih materija je takođe bio veći u otpadnoj vodi od ekstrakcionog soka, a one se sastoje od koloidnih nešećernih materija koje se lako uklanjaju koagulacijom i flokulacijom.

Iako analizirane džibre nisu sadržale veliku količinu lako taloživih materija, ipak su imale veliki sadržaj suspendovanih materija. Kako bi se utvrdio udeo suspendovanih materija

u HPK, džibre su centrifugirane na 3000 o/min (na centrifugi MLW T 52.1). Dobijeni talozi i supernatanti su analizirani, a rezultati su prikazani u Tabeli 22 i Tabeli 23.

**Tabela 22.** Rezultati analize taloga dobijenih nakon centrifugiranja otpadnih voda na 3000 o/min

Parametar:	Talog od:			
	ESOV	RSOV	GSOV	MOV
Suva materija (%)	26,68	27,26	30,90	37,61
Sadržaj azota (% suve materije)	6,23	4,42	4,46	5,15

Centrifugiranjem su dobijeni talozi sa velikim sadržajem vlage i azota koji verovatno potiče od ćelija kvasca. Ovakvi talozi bi se mogli koristiti kao stočna hrana, ali je prethodno potrebno izvršiti njihovu dodatnu analizu.

**Tabela 23.** Rezultati analize supernatanta dobijenih nakon centrifugiranja otpadnih voda na 3000 o/min

Parametar:	Supernatant od:			
	ESOV	RSOV	GSOV	MOV
HPK (mg O <sub>2</sub> /l)	50 298	45 046	64 590	98 112
Smanjenje HPK (%)	24,76	25,83	33,38	22,24
Sadržaj azota po Kjeldahl-u (mg/l)	563	680	589	4 933
Smanjenje sadržaja azota (%)	57,55	33,00	40,10	13,07

Sadržaj organskih materija, i posebno sadržaj azota su značajno smanjeni u supernatantima centrifugiranjem. Jedino u slučaju melasne otpadne vode nije postignuto jednako dobro smanjenje sadržaja azota kao u ostalim džibrama. Ipak, analizirane džibre su i dalje spadale u veoma zagađene vode nakon taloženja centrifugiranjem.

Pored centrifugiranja na 3000 o/min, izvedeno je i centrifugiranje džibri na 14000 o/min (na centrifugi Eppendorf 5804). Praćeno je smanjenje HPK, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 24.

**Tabela 24.** Rezultati analize supernatanta dobijenih nakon centrifugiranja otpadnih voda na 14000 o/min

Parametar:	Supernatant od:			
	ESOV	RSOV	GSOV	MOV
HPK (mg O <sub>2</sub> /l)	51 178	48 530	68 764	106 901
Smanjenje HPK (%)	23,44	20,09	29,08	15,27

Poređenjem rezultata za smanjenje HPK u otpadnim vodama prikazanih u Tabeli 23 i Tabeli 24, da se primetiti da povećanje broja obrtaja centrifugiranja sa 3000 o/min na 14000 o/min ne doprinosi poboljšanju uklanjanja organskih materija iz tretiranih otpadnih voda.



U sledećim eksperimentima sirovi ekstrakt pasulja (ekstrakcija sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri ekstrakcionom odnosu 1:100) je primenjen u ovim otpadnim vodama s ciljem uklanjanja organskih materija koagulacijom/flokulacijom. U testovima koagulacije je praćeno smanjenje HPK u džibrama pri različitim dozama koagulantata. Testovi koagulacije su izvedeni na originalnim pH vrednostima džibri. Dobijeni rezultati su dati u Tabeli 25.

**Tabela 25.** Uticaj doze koagulantata na smanjenje sadržaja organskih materija (određenih preko HPK) u otpadnim vodama nakon koagulacije

Doza koagulantata (ml/l)	Smanjenje sadržaja organskih materija (%) u:			
	ESOV (pH 4,23)	RSOV (pH 4,40)	GSOV (pH 4,24)	MOV (pH 5,40)
0,5	n.e.*	12,5	13,3	3,0
1	n.e.*	n.e.*	n.e.*	3,0
2	17,6	12,5	5,0	n.e.*
5	17,6	n.e.*	n.e.*	60,0
10	7,8	n.e.*	n.e.*	20,0
20	23,5	n.e.*	n.e.*	10,0

\* nema efekta

Kako se iz Tabele 25 može videti, veće smanjenje sadržaja organskih materija u otpadnim vodama od ekstrakcionog soka i melase je postignuto pri višim dozama koagulantata, dok su u slučaju otpadnih voda od retkog i gustog soka bolji rezultati postignuti pri nižim dozama koagulantata. S obzirom na to, u sledećim eksperimentima, u kojima je varirana pH vrednost otpadnih voda, za svaku od njih su izabrane po tri doze koje su dale najbolje rezultate, i to: 0,5 ml/l, 1 ml/l i 2 ml/l za RSOV i GSOV, i 5 ml/l, 10 ml/l i 20 ml/l za ESOV i MOV. Rezultati uticaja pH vrednosti na smanjenje sadržaja organskih materija u otpadnoj vodi od ekstrakcionog soka su dati u Tabeli 26.

**Tabela 26.** Uticaj pH vrednosti na smanjenje sadržaja organskih materija (određenih preko HPK) u ESOV nakon koagulacije

Doza koagulantata (ml/l)	Smanjenje sadržaja organskih materija (%) na:		
	pH 4,23 (originalni pH)	pH 6,50	pH 8,50
5	17,6	4,4	68,8
10	7,8	n.e.*	29,2
20	23,5	4,4	8,3

\*nema efekta

Dodatkom sirovog ekstrakta na pH 6,5 sadržaj organskih materija nije značajnije smanjen. Najbolji rezultat, smanjenje sadržaja organskih materija od 68,8%, je postignut na pH 8,5, pri dozi koagulantata 5 ml/l. Ovakav rezultat je donekle bio i očekivan s obzirom na to da se i tokom komercijalne proizvodnje šećera nečistoće iz ekstrakcionog soka uklanjaju taloženjem na pH 9.

Uticaj pH vrednosti na smanjenje sadržaja organskih materija u otpadnoj vodi od retkog soka je prikazan u Tabeli 27.

**Tabela 27.** Uticaj pH vrednosti na smanjenje sadržaja organskih materija (određenih preko HPK) u RSOV nakon koagulacije

Doza koagulant (ml/l)	Smanjenje sadržaja organskih materija (%) na:		
	pH 4,40 (originalni pH)	pH 6,48	pH 8,50
0,5	12,5	15,6	2,0
1	n.e.*	n.e.*	1,6
2	12,5	6,2	8,1

\*nema efekta

Prirodni koagulant iz pasulja se pokazao manje efikasnim u obradi džibre od proizvodnje bioetanola na retkom soku u poređenju sa džibrom od proizvodnje bioetanola na ekstrakcionom soku. Retki sok ne sadrži nečistoće kao ekstrakcioni sok (one su uklonjene u postupku prečišćavanja ekstrakcionog soka), i to bi moglo biti objašnjenje za mali doprinos prirodnog koagulant uklanjaњу organskih materija. Najbolji rezultat, smanjenje sadržaja organskih materija od 15,6%, je postignut na pH 6,48 kada je doza sirovog ekstrakta iznosila 0,5 ml/l. Ipak, ovaj rezultat nije značajno bolji od smanjenja sadržaja organskih materija koje se postiže na originalnoj pH vrednosti ove otpadne vode, što znači da bi se koagulacija mogla izvoditi i bez podešavanja pH vrednosti.

U Tabeli 28 su prikazani rezultati testova koagulacije izvedeni u džibri dobijenoj nakon proizvodnje bioetanola na gustom soku. Uklanjanje organskih materija se nije promenilo povećanjem pH vrednosti sa originalne 4,24 na 6,43, i bilo je najbolje (13,3%) sa najnižom primenjenom dozom koagulant 0,5 ml/l. Dalje povećanje pH vrednosti na 8,98 je dovelo do smanjenja efikasnosti uklanjanja organskih materija, pošto se sadržaj organskih materija čak i povećao nakon koagulacije pri dozama 0,5 ml/l i 1 ml/l. Ovo povećanje se može pripisati organskoj prirodi samog koagulant.

**Tabela 28.** Uticaj pH vrednosti na smanjenje sadržaja organskih materija (određenih preko HPK) u GSOV nakon koagulacije

Doza koagulant (ml/l)	Smanjenje sadržaja organskih materija (%) na:		
	pH 4,24 (originalni pH)	pH 6,43	pH 8,98
0,5	13,3	13,3	n.e.*
1	n.e.*	n.e.*	n.e.*
2	5,0	5,0	4,6

\*nema efekta

Uticaj pH vrednosti na uklanjanje organskih materija iz melasne džibre je prikazan u Tabeli 29. Povećanje pH vrednosti melasne džibre nije dovelo do poboljšanja uklanjanja organskih materija. Najbolja efikasnost uklanjanja organskih materija iz melasne džibre, 60%, je postignuta na originalnoj pH vrednosti ove otpadne vode, pri najmanjoj primenjenoj dozi koagulant 5 ml/l, što je značajno sa ekonomske tačke gledišta kod potencijalne primene ovog koagulant. Za razliku od situacije kod džibre od ekstrakcionog soka, gde je najbolja efikasnost uklanjanja organskih materija postignuta na visokoj pH vrednosti pri dozi od

5 ml/l, u slučaju melasne džibre je to postignuto pri istoj dozi, ali na nižoj (originalnoj) pH vrednosti.

**Tabela 29.** Uticaj pH vrednosti na smanjenje sadržaja organskih materija (određenih preko HPK) u MOV nakon koagulacije

Doza koagulanta (ml/l)	Smanjenje sadržaja organskih materija (%) na:		
	pH 5,40 (originalni pH)	pH 7,04	pH 8,99
5	60,0	12,4	15,0
10	20,0	n.e.*	10,0
20	10,0	n.e.*	n.e.*

\*nema efekta

Kao što se iz Tabela 27, 28 i 29 može videti, povećanje pH vrednosti nije dovelo do poboljšanja uklanjanja organskih materija kod džibri od retkog i gustog soka i melasnoj džibri, jer su materije koje bi dovele do poboljšanja koagulacije već prethodno uklonjene tokom postupka prečišćavanja ekstrakcionog soka dodatkom  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na pH 9.

Kada se rezultati dobijeni za primenu ekstrakta pasulja za smanjenje sadržaja organskih materija u ispitivanim džibrama uporede sa učinkom centrifugiranja kao metode obrade istoimenih džibri (Tabele 23 i 24), vidi se da se prirodni koagulanti ekstrahovani iz pasulja mogu uspešno primeniti umesto centrifugiranja za obradu džibre ekstrakcionog soka i melasne džibre.

Među sokovima koji se dobijaju kao međuproizvodi tokom proizvodnje šećera iz šećerne repe, a koji se mogu primeniti za fermentativno dobijanje etanola, ekstrakcioni sok je najpogodniji sa ekonomske tačke gledišta, jer su troškovi njegove proizvodnje značajno niži nego troškovi proizvodnje druga dva soka (retkog i gustog). Ekstrakcioni sok dobijen ekstrakcijom sa vodom iz repinih rezanaca, se može koristiti bilo direktno za proizvodnju bioetanola i šećera tokom kampanje, ili se može koncentrisati uparavanjem i u tom obliku čuvati nekoliko meseci (Henke et al., 2006). Stoga je u sledećoj grupi ogleđa detaljnije ispitana mogućnost primene ekstrakta pasulja za obradu džibre nastale nakon fermentativnog dobijanja etanola na ekstrakcionom soku.

U prvom koraku je otpadna voda nastala nakon laboratorijskog dobijanja bioetanola na ekstrakcionom soku analizirana. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 30. S obzirom na to da količina dobijene otpadne vode u jednoj šarži nije bila velika, ova voda je pripremana više puta, a u Tabeli 30 su date prosečne vrednosti sa standardnim devijacijama za svaki određivani parametar.

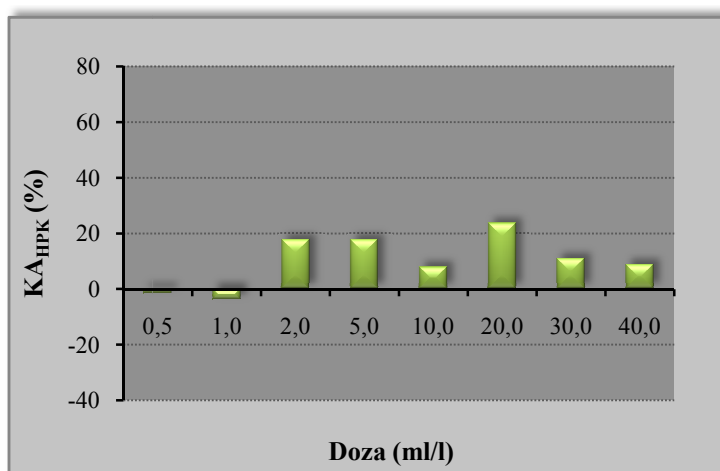
Kada se rezultati analize prikazani u Tabeli 30 uporede sa podacima iznesenim u radu Wilkie i saradnika (2000) može se zaključiti da je vrednost za HPK i ukupni azot u džibri ekstrakcionog soka slična onima kod džibre iz melase šećerne trske i više od vrednosti u džibri soka iz šećerne trske. Istovremeno, džibra melase šećerne repe ima veći HPK u poređenju sa džibrom ekstrakcionog soka, što se može objasniti prisustvom melanoidina, nastalih Maillard-ovom reakcijom šećera i proteina, i drugih obojenih materija. Iako su u prethodno pomenutom radu (Wilkie et al., 2000) prikazani podaci za veliki broj različitih džibri, oni se ne mogu uzeti kao generalno pravilo jer su koeficijenti varijacije (kada se izračunaju za podatke date u radu) dosta visoki – u opsegu od 25% - 75%. U poređenju sa

podacima za melasnu džibru šećerne trske prikazanim u radu Mohana i saradnika (2009), većina parametara džibre ekstrakcionog soka je mnogo niža.

**Tabela 30.** Rezultati analize otpadne vode dobijene nakon proizvodnje bioetanola na ekstrakcionom soku kao supstratu

Parametar:	Srednja vrednost ± standardna devijacija
pH	4,32 ± 0,13
Suva materija (mg/l)	41 040 ± 550
Pepeo (mg/l)	4 880 ± 510
Organska suva materija (mg/l)	35660 ± 360
% organske suve materije	86,88 ± 0,29
Suspendovane materije (mg/l)	14660 ± 260
Pepeo suspendovanih materija (mg/l)	1210 ± 300
Organska suva materija suspendovanih materija (mg/l)	13640 ± 210
Lako taložive materije (ml/l)	9,25 ± 3,88
Ukupni azot po Kjeldahl-u (mg/l)	1 323 ± 224
Fosfati (mg/l)	17 ± 4
HPK (mg O <sub>2</sub> /l)	83 178 ± 4 356

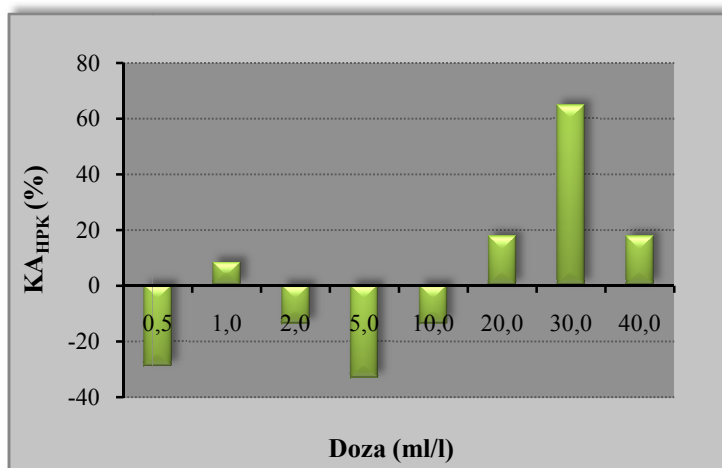
Za obradu ove otpadne vode, čiji su parametri dati u Tabeli 30, primenjen je sirovi ekstrakt pasulja dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl pri ekstrakcionom odnosu 1:100. U prvoj grupi testova koagulacije pH džibre nije podešavan, već su oni izvedeni na njenoj originalnoj vrednosti – pH 4,23, pri različitim dozama koagulant. Dobijene koagulacione aktivnosti su prikazane na Slici 86.



**Slika 86.** Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost u džibri ekstrakcionog soka na njenom originalnom pH, 4,23

Kako se sa histograma na Slici 86 vidi, bolji rezultati se postižu pri većim dozama koagulanta. Najveća koagulaciona aktivnost, 23,53%, je postignuta pri dozi sirovog ekstrakta 20 ml/l. Doze koagulanta niže od 2 ml/l se nisu pokazale kao dovoljno dobre za koagulaciju na ovoj pH vrednosti, s obzirom na to da se HPK u otpadnoj vodi čak povećao nakon testa.

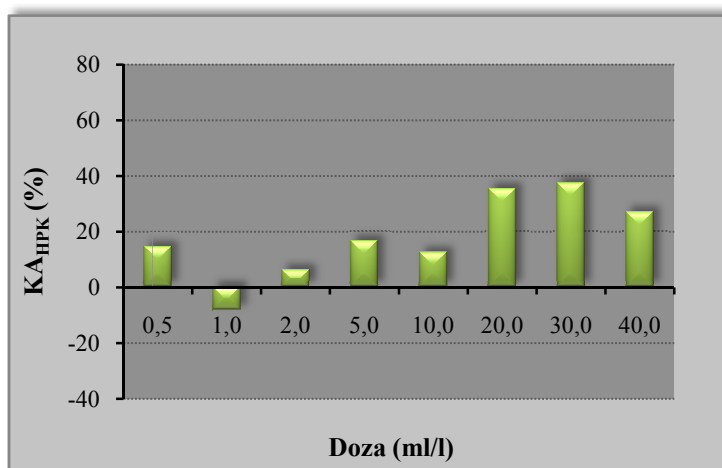
U sledećem ogledu, pH vrednost otpadne vode je podešena na 5,2 dodatkom 33% NaOH. Zavisnost koagulacione aktivnosti od primenjene doze sirovog ekstrakta pasulja je prikazana na Slici 87.



**Slika 87.** Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost u džibri ekstrakcionog soka na pH 5,2

U poređenju sa prethodnim eksperimentom, povećanje pH vrednosti je dovelo do efikasnijeg uklanjanja organskih materija iz džibre pri većim dozama koagulanta. Najveća efikasnost je postignuta pri dozi sirovog ekstrakta 30 ml/l, kada je postignuto smanjenje sadržaja organskih materija, izraženo preko HPK, od 64,71%. Na ovoj pH vrednosti, niže doze sirovog ekstrakta su bile čak i manje efikasne nego na pH 4,23, s obzirom na to da je povećanje sadržaja organskih materija u obrađenoj vodi bilo značajno pri dozama 0,5 ml/l i 5 ml/l.

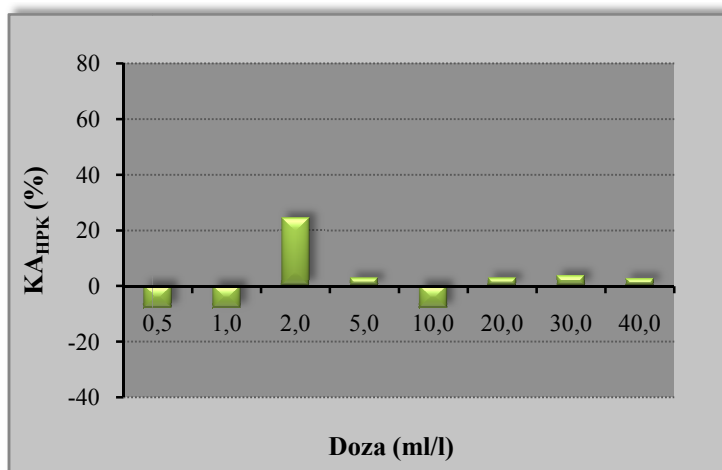
Sledeća grupa testova koagulacije u džibri ekstrakcionog soka je izvedena na pH 6. Na Slici 88 su prikazani rezultati.



**Slika 88.** Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost u džibri ekstrakcionog soka na pH 6

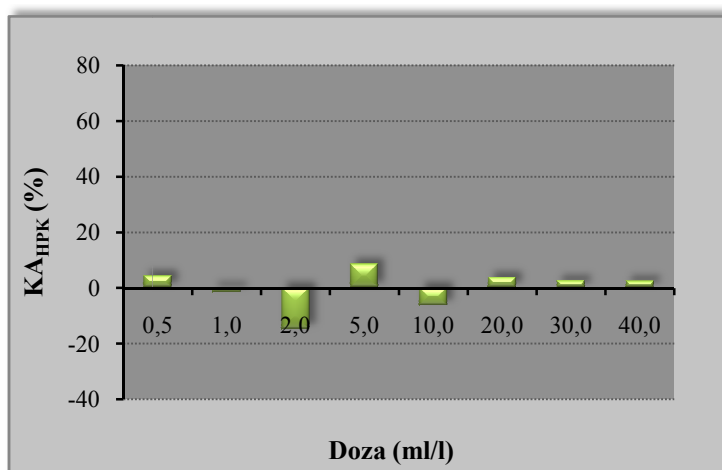
Najbolja koagulaciona aktivnost je postignuta pri istoj dozi (30 ml/l) kao i u testovima koagulacije izvedenim na pH 5,2, ali je ona skoro duplo niža – 37,5%. Pri dozi sirovog ekstrakta od 20 ml/l postignuta je neznatno niža koagulaciona aktivnost (35,42%), pa ova doza može biti preporučena na ovoj pH vrednosti, jer se skoro isti efekat postiže smanjenjem doze za jednu trećinu u odnosu na dozu pri kojoj je postignuta maksimalna aktivnost.

pH vrednost 6,7 je bila sledeća vrednost na kojoj je ispitana efikasnost uklanjanja organskih materija iz otpadne vode od proizvodnje bioetanola na ekstrakcionom soku kao podlozi. Uticaj doze koagulant na njegovu koagulacionu aktivnost na ovoj pH vrednosti je prikazan na Slici 89. Najveća koagulaciona aktivnost je postignuta pri niskoj dozi sirovog ekstrakta od 2 ml/l, i iznosila je 24,32%.



**Slika 89.** Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost u džibri ekstrakcionog soka na pH 6,7

Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost na pH 7,5 je prikazan na Slici 90.

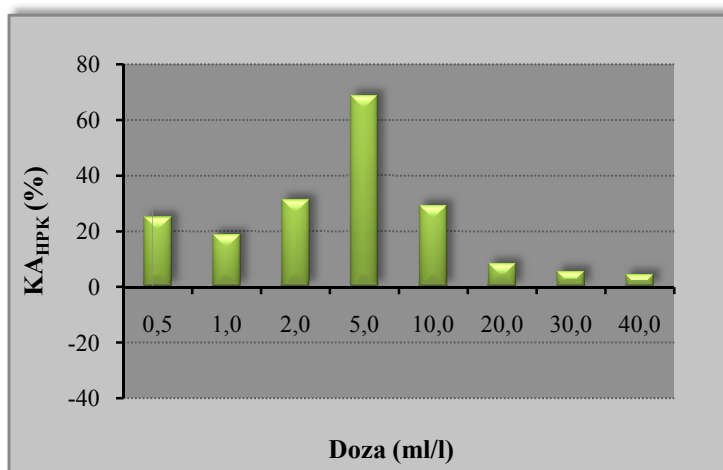


**Slika 90.** Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost u džibri ekstrakcionog soka na pH 7,5

Kao što se vidi sa histograma, pH vrednost 7,5 se pokazala kao neodgovarajuća za uklanjanje organskih materija iz džibre ekstrakcionog soka primenom prirodnog koagulant ekstrahovanog iz pasulja. Na ovoj pH vrednosti, koagulaciona aktivnost ekstrakta je bila neznatna pri skoro svim primenjenim dozama. Moguće objašnjenje za ovakvo ponašanje je

hemijska kompleksnost ekstrakcionog soka šećerne repe. Naime, sok šećerne repe sadrži ugljene hidrate, proteine, aminokiseline, organske kiseline, pektinske materije, masti, saponine i mineralne materije (Petrov, 1994). Takođe, i hemijski sastav ekstrakta pasulja je veoma kompleksan. Uzevši sve to u obzir, može se pretpostaviti da se oko pH 7,5 odigravaju neke hemijske reakcije, koje mogu blokirati ili materije koje poseduju koagulacionu aktivnost, ili materije koje čine zagađenje – u svakom slučaju proces koagulacije je tada onemogućen. Kada se sagledaju rezultati dobijeni u prethodnom (pH 6,7) i ovom (pH 7,5) eksperimentu, može se zaključiti da pH vrednost oko neutralne nije pogodna za ovaj vid tretmana džibre ekstrakcionog soka.

Efikasnost koagulacije ekstrakta pasulja u džibri ekstrakcionog soka u baznoj sredini je ispitana na pH 8,5, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 91. U ovoj grupi eksperimenata, doza od 5 ml/l se pokazala kao najbolja, postižući smanjenje sadržaja organskih materija od 68,75%, što je bila i najveća postignuta koagulaciona aktivnost u svim eksperimentima izvedenim tokom primene ekstrakta pasulja za obradu džibre ekstrakcionog soka. Približna koagulaciona aktivnost je postignuta na pH 5,2, ali sa 6 puta većom dozom ekstrakta. Objašnjenje za to može ležati u činjenici koja je ranije u tekstu već pomenuta, a to je da se ekstrakcioni sok u tehnologiji šećera inače prečišćava taloženjem balastnih materija na pH 9, što znači da na pH 8,5 verovatno takođe dolazi do delimičnog taloženja ovih materija usled dodatka hidroksida, pa se smanjuje i potrebna doza ekstrakta pasulja. Nasuprot svim ostalim ispitivanim pH vrednostima, povećanje sadržaja organskih materija u tretiranoj otpadnoj vodi nije zabeleženo ni pri jednoj primenjenoj dozi na ovoj pH vrednosti (pH 8,5).

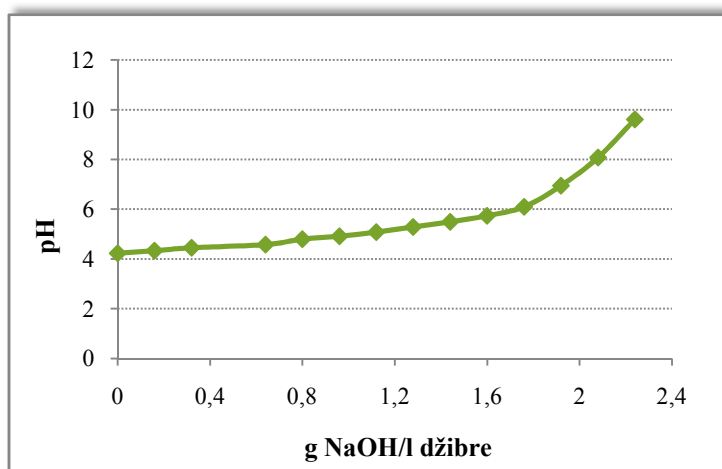


**Slika 91.** Uticaj doze sirovog ekstrakta pasulja na koagulacionu aktivnost u džibri ekstrakcionog soka na pH 8,5

Ovakvim detaljnijim ispitivanjima koagulacionog ponašanja prirodnog koagulant ekstrakcionog iz pasulja u ESOV se stiče novi uvid u mogućnost njegove primene u odnosu na ispitivanja mnogo manjeg obima čiji su rezultati prikazani u Tabeli 26. Na osnovu toga se može zaključiti da je potrebno prethodno izvesti detaljna ispitivanja kada se želi primeniti neki prirodni koagulant u određenoj otpadnoj vodi.

Kada se uzmu u obzir svi napred prikazani rezultati, može se reći da su pH 5,2 sa dozom sirovog ekstrakta 30 ml/l i pH 8,5 sa dozom sirovog ekstrakta 5 ml/l najprikladniji za obradu otpadne vode dobijene nakon fermentativne proizvodnje etanola na ekstrakcionom soku šećerne repe prirodnim koagulantima ekstrahovanim iz pasulja. S obzirom na to, u sledećem delu ispitivanja su utvrđene potrošnje NaOH za podešavanje pH, potrebne količine pasulja i potrebne količine NaCl za pripremu ekstrakata kako bi se procenilo koja od prethodne dve kombinacije parametara je podesnija sa ekonomskog stanovišta. U tom smislu,

prvo je praćena promena pH vrednosti džibre ekstrakcionog soka sa dodatkom 2 mol/l NaOH tako što je inkrement od 0,2 ml baze dodavan u 100 ml otpadne vode. Rezultati su prikazani na Slici 92.



**Slika 92.** Promena pH vrednosti otpadne vode sa dodatkom NaOH

Na osnovu grafika sa Slike 92 se mogu utvrditi količine NaOH potrebne za podešavanje pH vrednosti na 5,2 i 8,5 u 1 m<sup>3</sup> ove otpadne vode, i one su iznosile 1224 g i 2120 g, respektivno.

Kako su najbolje koagulacione aktivnosti na pH 5,2 i 8,5 postignute sa dozama 30 ml/l i 5 ml/l, respektivno, i uz uzimanje u obzir ekstrakcionog odnosa, izračunate su količine pasulja i NaCl (za pripremu 0,5 mol/l rastvora NaCl kojim se izvodi ekstrakcija) potrebne za obradu 1 m<sup>3</sup> otpadne vode. Izračunate potrošnje su prikazane u Tabeli 31.

**Tabela 31.** Procenjena potrošnja NaOH, pasulja i NaCl za obradu 1 m<sup>3</sup> džibre ekstrakcionog soka na pH 5,2 i 8,5

pH	Doza koagulant (ml/l)	Potrošnja:		
		NaOH (g)	Samleveni pasulj (g)	NaCl (g)
5,2	30	1 224	300	877
8,5	5	2 120	50	146

Iz rezultata navedenih u Tabeli 31 se može zaključiti da je pH 8,5 pogodniji za obradu ove otpadne vode od pH 5,2, jer iako je potrebna veća količina NaOH za korekciju pH vrednosti na pH 8,5 nego na pH 5,2, na pH 8,5 se troši mnogo manja količina pasulja i NaCl. Pored toga, dozvoljeni pH u otpadnoj vodi koja se ispušta u javnu kanalizaciju je 6,5 – 9,5, a koja se ispušta u recipijent 6,5 – 9,0 (Uredba, 2011 i 2012), tako da, ukoliko se prirodni koagulant iz zrna pasulja primenjuju na pH 8,5, nije potrebno naknadno podešavanje pH vrednosti obrađene otpadne vode.

S obzirom na to da u dostupnoj literaturi postoji samo par radova vezanih za primenu prirodnih koagulanata u obradi realnih otpadnih voda, nemoguće je detaljnije poređenje rezultata postignutih obradom različitih džibri ekstraktom dobijenim iz pasulja. Grupa autora okupljena oko Beltrán-Heredia-e je ispitivala uklanjanje boja primenom modifikovanog koagulant na bazi tanina i ekstrakta *M. oleifera*-e (Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2008; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2009a; Beltrán-Heredia et al., 2009; Beltrán-



Heredia et al., 2009b; Beltrán-Heredia et al., 2009a), pri čemu su postigli veoma dobru efikasnost uklanjanja anjonskih boja – od 80% do 99%. Ipak, u okviru ovih ispitivanja efikasnost dekolorizacije je ispitivana u model obojenim vodama, u kojima se ne nalaze druge različite komponente koje su prisutne u realnim industrijskim otpadnim vodama.

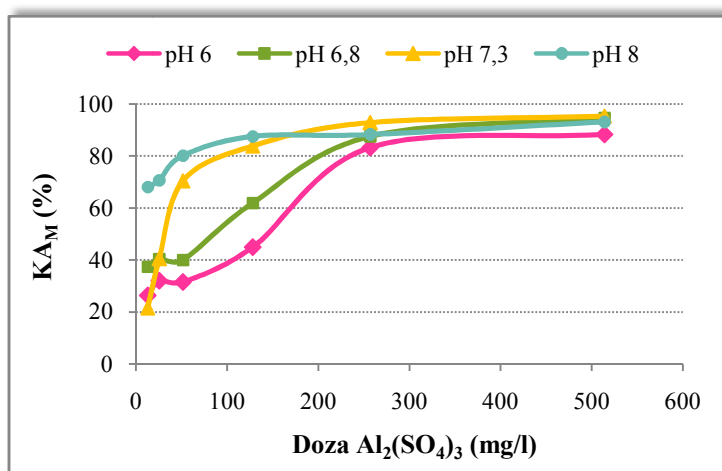
Druga grupa autora – S. Bhatia, Z. Othman i A.L. Ahmad (Bhatia et al., 2007a; Bhatia et al., 2007b) – su ispitivali mogućnost primene vodenog ekstrakta *M. oleifera*-e za tretman realne otpadne vode, odnosno otpadne vode od proizvodnje palminog ulja. Iako se radi o potpuno drugoj otpadnoj vodi, ipak se donekle može napraviti poređenje između nje i otpadnih voda iz proizvodnje bioetanola. Otpadna voda od proizvodnje palminog ulja je blago kisela kao i džibre, imaju sličan sadržaj suve materije (osim melasne džibre čiji je sadržaj suve materije oko 3 puta veći) i suspendovanih materija, i obojene su. Otpadna voda od proizvodnje palminog ulja ima visok HPK, ali džibre imaju od 1,5 pa čak do više od 3 puta (melasna džibra) veći. Sadržaj ukupnog azota je takođe veći u džibrama (u melasnoj džibri čak 7 puta). Bhatia i saradnici (2007b) su postigli smanjenje HPK od 52,2% u otpadnoj vodi od proizvodnje palminog ulja primenom ekstrakta *M. oleifera*-e pri dozi od 6000 mg/l, dok je primenom 120 puta manje doze (5 ml/l = 50 mg/l kada se preračuna na masu pri datom ekstrakcionom odnosu) ekstrakta pasulja postignuto maksimalno smanjenje HPK blizu 70% u otpadnoj vodi od proizvodnje bioetanola na ekstrakcionom soku kao supstratu.

#### **4.12. PRIMENA PRIRODNIH KOAGULANATA IZ PASULJA U KOMBINACIJI SA ALUMINIJUMOM KAO TRADICIONALNIM KOAGULANTOM**

Cilj eksperimenata izvedenih u okviru ovog poglavlja doktorske disertacije je bio da se ispita mogućnost primene ekstrakta pasulja kao pomoćnog koagulanta u kombinaciji sa aluminijum-sulfatom.  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18\text{H}_2\text{O}$  je pripreman kao procentni rastvor. Testovi koagulacije su izvedeni u model vodi početne mutnoće 35 NTU pri različitim pH vrednostima, a ekstrakt pasulja je dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl kao ekstragensom, pri čemu je ekstrakcioni odnos iznosio 1:100. U sirovom ekstraktu je određen sadržaj proteina – 2,3050 mg/ml.

U prvom ogledu, ispitana je koagulaciona aktivnost samog aluminijum-sulfata na različitim pH vrednostima i pri različitim dozama. Kako aluminijum-sulfat snižava pH vrednost u obrađenoj vodi, prethodno su utvrđene potrebne količine rastvora NaOH i HCl za korekciju pH vrednosti, i te količine su dodavane u model vodu prilikom izvođenja testova koagulacije istovremeno sa dodatkom aluminijum-sulfata. Zavisnost koagulacione aktivnosti aluminijum-sulfata od primenjene doze pri različitim pH vrednostima model vode je prikazana na Slici 93.

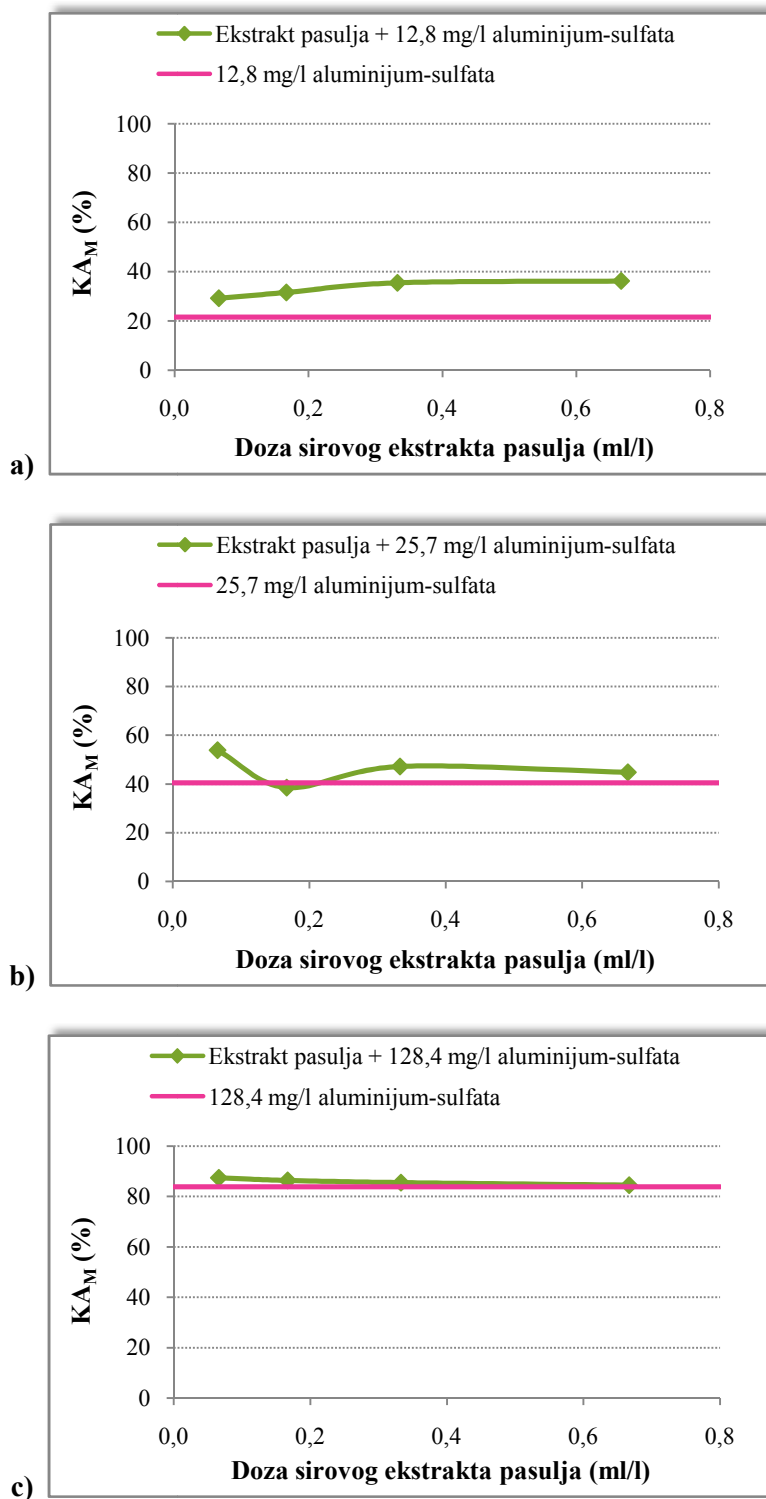
Sa Slike 93 se vidi da je koagulaciona aktivnost aluminijum-sulfata u oblasti nižih primenjenih doza veća pri višim vrednostima pH – na pH 6 i 6,8 optimalna doza je oko 250 mg/l, a na pH 7,3 i 8 optimalna doza je upola manja. Na pH vrednosti 8 aluminijum-sulfat je pokazao iznenađujuće dobru koagulacionu aktivnost pri vrlo malim dozama, pa je pri dozi od 12,8 mg/l njegova koagulaciona aktivnost 68,11%, što je više nego duplo u poređenju sa aktivnošću pri istoj dozi na nižim pH vrednostima. Tokom rada je primećeno da je talog na pH vrednosti 8 drugačijeg izgleda – dobijaju se flokule praškastog izgleda, dok su pri nižim pH vrednostima one pahuljaste.



**Slika 93.** Zavisnost koagulacione aktivnosti aluminijum-sulfata od primenjene doze pri različitim pH vrednostima model vode

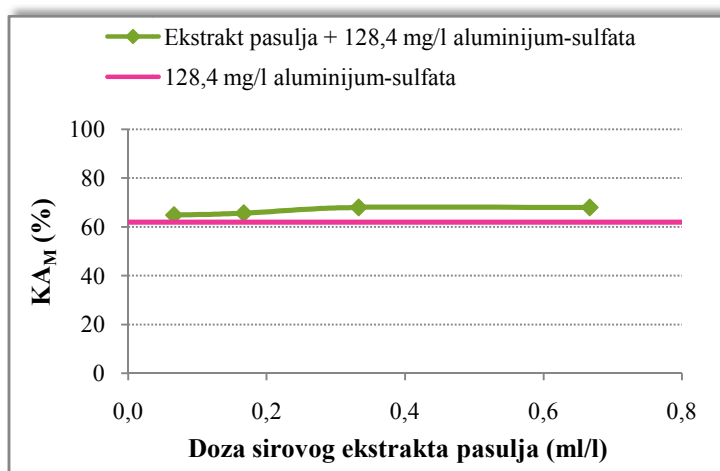
Naredni ogledi su izvođeni tako da je u model vodu dodavana fiksna doza aluminijum-sulfata, a varirana je doza sirovog ekstrakta pasulja. Eksperimenti su izvedeni na različitim pH vrednostima. Na Slici 94 su prikazane zavisnosti koagulacione aktivnosti kombinacije koagulanata (aluminijum-sulfat + sirovi ekstrakt pasulja) od primenjene doze sirovog ekstrakta na pH 7,3.

Sa grafika prikazanih na Slici 94 se vidi da na ovoj pH vrednosti (pH 7,3) pri nižim dozama aluminijum-sulfata dodatak sirovog ekstrakta pasulja doprinosi poboljšanju efikasnosti koagulacije, dok u slučaju primene veće doze aluminijum-sulfata, dodatak sirovog ekstrakta nema uticaja na koagulacionu aktivnost. Pri dozi aluminijum-sulfata 12,8 mg/l (Slika 94a), dodatak 0,67 ml/l sirovog ekstrakta povećava koagulacionu aktivnost sa 21,51% (kada se primeni samo 12,8 mg/l aluminijum-sulfata) na 36,2% (kada se primeni ista doza aluminijum-sulfata u kombinaciji sa sirovim ekstraktom). U slučaju primene 25,7 mg/l aluminijum-sulfata (Slika 94b), dodatak male doze sirovog ekstrakta (0,07 ml/l) je doveo do povećanja koagulacione aktivnosti sa 40,45% na 53,87%. Pri dozi 128,4 mg/l aluminijum-sulfata (Slika 94c), njegova koagulaciona aktivnost je već dosta visoka, pa dodatak ekstrakta pasulja samo neznatno povećava koagulacionu aktivnost. Ghebremichael i saradnici (2009) su takođe ispitivali mogućnost primene prirodnog koagulant ekstrahovanog iz *M. oleifera*-e kao pomoćnog koagulant aluminijum-sulfatu u vodi početne mutnoće 116 NTU, i postigli povećanje koagulacione aktivnosti u proseku za oko 20% (pri kombinacijama različitih doza koagulanata). Iz prethodnih rezultata se vidi da je primenom ekstrakta pasulja kao pomoćnog koagulant uz 25,7 mg/l aluminijum-sulfata, koagulaciona aktivnost povećana za 13% pri dozi ekstrakta od 0,7 mg/l, što je 2 – 4 puta manja doza u odnosu na doze primenjene u pomenutom radu (Ghebremichael et al., 2009). Takođe, primenom ekstrakta pasulja kao pomoćnog koagulant se doza aluminijum-sulfata može smanjiti za 50% (sa 25,7 mg/l na 12,8 mg/l), a da se postigne približno jednaka efikasnost bistrenja. Do sličnog podatka su došli i Ghebremichael i saradnici (2009), koji navode smanjenje potrebne doze aluminijum-sulfata za oko 50 – 75% uz primenu ekstrakta *M. oleifera*-e, dok su Muyibi i Evison (1996) prilikom tretmana rečnih voda čija se mutnoća kretala u opsegu od 105 NTU do 350 NTU dodatkom ekstrakta *M. oleifera*-e kao pomoćnog koagulant aluminijum-sulfatu postigli smanjenje potrebne zapremine aluminijum-sulfata za 40%.



**Slika 94.** Koagulaciona aktivnosti kombinacije koagulanata – fiksna doza aluminijum-sulfata + promenljiva doza sirovog ekstrakta pasulja na pH 7,3, pri dozama aluminijum-sulfata: a) 12,8 mg/l, b) 25,7 mg/l i c) 128,4 mg/l

Testovi koagulacije sa dozom aluminijum-sulfata 128,4 mg/l su izvedeni i na pH 6,8. Rezultati su prikazani na Slici 95.



**Slika 95.** Koagulaciona aktivnosti kombinacije koagulanata – fiksna doza aluminijum-sulfata 128,4 mg/l + promenljiva doza sirovog ekstrakta pasulja na pH 6,8

Prirodni koagulantni prisutni u ekstraktu pasulja su u ovom slučaju pokazali nešto bolji uticaj na ukupnu koagulacionu aktivnost nego pri istoj dozi aluminijum-sulfata i prirodnih koagulanata na pH 7,3, ali je ukupna koagulaciona aktivnost postignuta kombinacijom koagulanata bila značajno niža, kao i koagulaciona aktivnost samog aluminijum-sulfata. Maksimalno ostvareno povećanje koagulacione aktivnosti od oko 6% je postignuto pri većim primenjenim dozama sirovog ekstrakta pasulja. Smanjenjem doze aluminijum-sulfata za oko 5 puta (sa 128,4 mg/l na 25,7 mg/l) uz blago povećanje pH sa 6,8 na 7,3 (Slika 94b), postiže se približna efikasnost bistrenja model vode.

#### **4.13. KARAKTERIZACIJA I MOGUĆNOST PRIMENE ISCRPLJENOG PASULJA NAKON EKSTRAKCIJE PRIRODNIH KOAGULANATA**

S obzirom na visoku hranljivu vrednost pasulja, ostatak pasulja nakon ekstrakcije bi mogao biti iskorišćen kao dodatak stočnoj hrani, što bi predstavljalo dodatnu vrednost postupka dobijanja prirodnih koagulanata. Kako bi se ova mogućnost proverila, ispitan je hemijski sastav kako samog pasulja, tako i ostataka nakon ekstrakcije prirodnih koagulanata destilovanom vodom i 0,5 mol/l rastvorom NaCl (pri ekstrakcionom odnosu 1:20). Rezultati analize su prikazani u Tabeli 32.

U svim ispitivanim uzorcima sadržaj suve materije se kreće iznad 90%. Sadržaj pepela se smanjio u pasulju iz koga su koagulantni ekstrahovani destilovanom vodom u odnosu na netretiran pasulj, dok se u pasulju nakon ekstrakcije sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl sadržaj pepela povećao. Povećanje sadržaja mineralnih materija u pasulju tretiranom sa rastvorom NaCl je posledica zaostajanja dela natrijum-hlorida u talogu pasulja nakon ekstrakcije, dok se smanjenje procenta pepela u pasulju tretiranom vodom može objasniti rastvaranjem dela mineralnih materija iz pasulja tokom ekstrakcije s obzirom na to da je ona izvedena destilovanom vodom, u kojoj nema jona. Sadržaj proteina u tretiranom pasulju je smanjen za oko 50% nakon ekstrakcije destilovanom vodom i za oko 75% nakon ekstrakcije rastvorom NaCl. Procenat ukupnih i nerastvorljivih vlakana se povećao u pasulju nakon ekstrakcije, što je i razumljivo s obzirom na to da su tokom ekstrakcije u ekstrakt prešli proteini, ugljeni hidrati i druge rastvorljive materije. Ipak, određena količina proteina zaostaje u pasulju nakon ekstrakcije, što ovakav pasulj svakako čini pogodnim kao dodatak stočnoj hrani. Takođe,

prisustvo nerastvorljivih vlakana u stočnoj hrani povoljno utiče na digestivni trakt kako preživara, tako i životinja koje nisu preživari (Montagne et al., 2003; Hedemann et al., 2006).

**Tabela 32.** Hemijski sastav pasulja, i ostataka pasulja nakon ekstrakcije prirodnih koagulanata destilovanom vodom i 0,5 mol/l rastvorom NaCl

Parametar	Pasulj	Ostatak pasulja nakon ekstrakcije destilovanom vodom	Ostatak pasulja nakon ekstrakcije 0,5 mol/l rastvorom NaCl
Suva materija (%)	93,3	94,1	93,5
Pepeo (%)	4,6	1,7	11,0
Ukupni azot po Kjeldahl-u (% SM)	3,4	1,6	1,0
Proteini (% SM)	21,2	10,0	6,2
Ukupna vlakna (%)	15,3	23,2	20,5
Nerastvorljiva vlakna (%)	11,7	24,5	23,6
Rastvorljiva vlakna (%)	3,6	0	0

Na osnovu ovakvih rezultata, može se zaključiti da pasulj koji preostaje nakon ekstrakcije sa destilovanom vodom može biti korišćen kao dodatak stočnoj hrani, a pasulj nakon ekstrakcije sa rastvorom NaCl bi trebalo dodatno ispitati kako bi se utvrdio sadržaj soli, odnosno da li je sadržaj NaCl-a u pasulju nakon ekstrakcije toliki da se on ne bi mogao koristiti kao dodatak stočnoj hrani.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ispitivanja prirodnih koagulanata dobijenih iz zrna pasulja (*Phaseolus vulgaris*), prikazanih u okviru ovog rada, izvedeni su sledeći zaključci.

- Ispitivanjem uticaja različitih parametara na ekstrakciju prirodnih koagulanata iz zrna pasulja utvrđeno je da je dovoljno vreme ekstrakcije 10 minuta, na temperaturi 20°C. Filtracija dobijene suspenzije je obavezan korak prilikom pripreme ekstrakata, jer su neprofiltrirani ekstrakti u mnogim slučajevima čak povećavali rezidualnu mutnoću tretirane vode.
- Ispitivanje uticaja primenjenog ekstragensa na koagulacionu aktivnost dobijenih ekstrakata je urađeno za ekstrakt dobijen ekstrakcijom sa destilovanom vodom i za ekstrakt dobijen ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl. Koagulaciona aktivnost ova dva ekstrakta je praćena u model vodama različitih početnih mutnoća (50, 100 i 200 NTU) i pH vrednosti (6, 8 i 10).

Na pH vrednosti 6 i 8, i pri nižim početnim mutnoćama model vode (50 i 100 NTU), ekstrakti se ponašaju veoma slično, i imaju ili zanemarljivu, ili čak i negativnu koagulacionu aktivnost. Na pH vrednosti 6 i početnoj mutnoći model vode 200 NTU, ponašanje vodenog i NaCl-ekstrakta je različito. Vodeni ekstrakt pokazuje relativno ujednačenu koagulacionu aktivnost pri svim primenjenim dozama, sa maksimalnom koagulacionom aktivnošću od 58,4% pri dozi 0,1 ml/l. NaCl-ekstrakt ima značajno veću koagulacionu aktivnost od vodenog ekstrakta pri nižim dozama, dok pri višim dozama njegova aktivnost mnogo brže opada u poređenju sa vodenim ekstraktom. Maksimalnu koagulacionu aktivnost, 83,5%, ovaj ekstrakt postiže pri dozi 0,4 ml/l. Na pH vrednosti 8 u model vodi početne mutnoće 200 NTU i jedan i drugi ekstrakt postižu maksimalnu aktivnost pri dozi 0,2 ml/l, i to 31,3% vodeni ekstrakt i 58,1% NaCl-ekstrakt. U slučaju model vode čija je pH vrednost 10, vodeni i NaCl-ekstrakt se ponašaju znatno drugačije.

Pored razlika koje su ekstrakti pokazali prilikom koagulacije, kao i različitog sadržaja pojedinih komponenti, postojala je i razlika u njihovom izgledu: vodeni ekstrakt je imao izgled mlečno bele suspenzije, kod koje stajanjem relativno brzo dolazi do izdvajanja belog taloga, dok je NaCl-ekstrakt bio žućkasto-bele boje, lepljiv i talog se izdvajao znatno sporije.

S obzirom na to da su i vodeni i NaCl-ekstrakt, u zavisnosti od uslova sredine, pokazali dobru koagulacionu aktivnost, u daljim ispitivanjima je rađeno i sa jednim i sa drugim ekstraktom.

- Analiza sastava ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa 0,5 mol/l rastvorom NaCl iz celog zrna pasulja, iz jezgra, i iz pokožice pasulja je pokazala da je sadržaj ukupnih šećera, proteina i fenolnih materija najveći u ekstraktu iz celog zrna pasulja, a najniži u ekstraktu iz pokožice. Sadržaj fitinske kiseline je najveći u ekstraktu pokožice.

Ispitivanjem koagulacionih svojstava ovih ekstrakata u model vodama različitih pH vrednosti, utvrđeno je da je u smislu uklanjanja mutnoće najefikasniji sirovi ekstrakt jezgra pasulja, a najmanje efikasan sirovi ekstrakt pokožice pasulja. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da materije iz pokožice na neki način ometaju koagulacionu aktivnost materija iz jezgra.

Najbolji rezultat, što se tiče uticaja na sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi, je postignut nakon primene sirovog ekstrakta pokožice, što u ovom slučaju nije od značaja zbog pomenute niske koagulacione aktivnosti ovog ekstrakta. Uklanjanjem pokožice iz pasulja postiže se poboljšanje koagulacione aktivnosti, dok je povećanje sadržaja organskih materija u obrađenoj vodi samo donekle umanjeno, ali s obzirom na to da je postupak njenog uklanjanja komplikovan, ekstrakcija je u daljem radu izvođena iz celog zrna pasulja.

- Ispitivanjem trajnosti ekstrakata, utvrđeno je da ekstraktu čuvanom u frižideru (na +4°C) nakon par dana opada koagulaciona aktivnost, što se objašnjava promenama u njegovom sastavu koje su posledica dekompozicije organskih materija od strane mikroorganizama. S obzirom na ove rezultate, pripremljeni koagulantni su u daljem radu zamrzavani, i tako čuvani do samog izvođenja eksperimenata. Tokom rada koji je usledio nakon ovih eksperimenata, a koji je trajao u dužem vremenskom periodu (2 – 3 godine), nije primećena značajnija promena efikasnosti tako čuvanih koagulanata.
- Nakon ispitivanja uticaja različitih parametara na koagulacionu aktivnost prirodnih koagulanata iz zrna pasulja za dalji rad je izabrano trajanje brzog mešanja od 1 minut, dužina sporog mešanja od 30 minuta i vreme taloženja 1 h.
- Na osnovu rezultata ispitivanja optimalne doze koagulantna u odnosu na početnu mutnoću i pH vrednost model vode, za oba ispitivana ekstrakta pasulja se može reći da su efikasniji u model vodama velike početne mutnoće (200 NTU). U ovim model vodama, ekstraktima više odgovara niža pH vrednost (pH 6), kada pri veoma niskim dozama postižu maksimum efikasnosti. Ukoliko se radi o model vodama male početne mutnoće, tada koagulantima više odgovara visoka pH vrednost (pH 10), ali tada se koagulaciona aktivnost pre, ili većim delom, može pripisati delimičnom izdvajanju  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  nego samoj aktivnosti koagulanata. Srednje pH vrednosti (pH 8) ne odgovaraju koagulantima koji se nalaze u ekstraktima pasulja.

U slučaju i jednog i drugog ispitivanog ekstrakta pasulja se za većinu model voda izabrane početne mutnoće i pH vrednosti, maksimalna koagulaciona aktivnost javlja pri niskim primenjenim dozama.

- Pre prečišćavanja prirodnih koagulanata iz zrna pasulja jonoizmenjivačkom hromatografijom, proteini su iz ekstrakata zrna pasulja izdvojeni taloženjem sa amonijum-sulfatom. Ispitivanjem vezivanja proteina iz dobijenih dijalizata na jonoizmenjivačke smole Wofatit, Amberlite™ IR 120Na, Resinex TPX 4500, Amberlite™ IRA 400Cl, Amberlite™ IRA 958Cl i Amberlite™ IRA 900Cl, utvrđeno je da jonoizmenjivačka smola Amberlite™ IRA 900Cl ima najveći kapacitet za njihovo vezivanje.

Prečišćavanje proteina na jonoizmenjivaču Amberlite™ IRA 900Cl je izvedeno kolonskom hromatografijom, pri čemu je eluiranje vezanih proteina izvođeno u dva režima rada: kontinualno i diskontinualno. Optimizacija eluiranja u kontinualnim uslovima je izvođena kroz eluiranje u linearnom i više različitih eksponencijalnih gradijenata koncentracije rastvora NaCl, kako bi se postiglo što bolje razdvajanje proteina. Sa dobijenih elucionih dijagrama, na kojima je uporedo prikazana koncentracija proteina u dobijenim frakcijama i njihova koagulaciona aktivnost, uočljivo je da je poklapanje proteinskih i koagulacionih pikova samo delimično, odnosno veliki sadržaj proteina ne mora obavezno značiti i visoku koagulacionu

aktivnost, i obrnuto. Takođe, dobijeni elucioni dijagrami ukazuju da dijalizat dobijen iz ekstrakta semena pasulja sadrži veći broj proteina koji su veoma slični po naelektrisanju, pa se na ovaj način ne mogu u potpunosti dobro razdvojiti.

Na osnovu elucionog dijagrama dobijenog eluiranjem proteina sa jonoizmenjivačke smole u eksponencijalnom gradijentu koncentracije rastvora NaCl od 0,6 mol/l – 1,3 mol/l za vreme od 60 minuta i uz prethodno ispiranje jonoizmenjivačke smole 0,6 mol/l rastvorom NaCl, određene su koncentracije rastvora NaCl kojima će se u sledećem koraku izvesti stupnjevito eluiranje proteina u diskontinualnim uslovima. Ovakvim eluiranjem je dobijeno 6 frakcija u kojima je određena koncentracija proteina, i čija koagulaciona aktivnost je utvrđena u model vodi početne mutnoće 200 NTU i pH vrednosti 9. Sve frakcije imaju veoma slično koagulaciono ponašanje i postigle su visoku koagulacionu aktivnost, sa maksimumima koji su se kretali od 87,7% do 92,8%. U testovima koagulacije u kojima se koagulaciona aktivnost kretala oko maksimalne za datu frakciju, obrazovale su se veoma krupne flokule, vidljive golim okom, koje su se i taložile dosta brzo.

Prečišćavanjem prirodnih koagulanata iz semena pasulja na jonoizmenjivačkoj smoli Amberlite™ IRA 900Cl se dobijaju frakcije visoke koagulacione aktivnosti, ali i dijalizat čijim su prečišćavanjem kolonskom jonoizmenjivačkom hromatografijom dobijene te frakcije je takođe postigao aktivnost oko 80%. Dijalizat sadrži istaložene proteine, pa njegova koagulaciona aktivnost potvrđuje pretpostavku da su proteini u ekstraktu pasulja aktivni koagulant. Međutim, kako je i supernatant, dobijen nakon odvajanja taloga proteina, pokazao visoku koagulacionu aktivnost, može se zaključiti da i neke druge materije, neproteinske prirode, koje su prisutne u ekstraktu iz zrna pasulja imaju koagulacionu sposobnost. S obzirom na rezultate analize ekstrakata, koje pokazuju da ekstrakti pasulja sadrže visok procenat ugljenih hidrata, od kojih najveći deo čini škrob, i na literaturne podatke koji govore u prilog koagulacione aktivnosti ugljenih hidrata, i među njima škroba, može se pretpostaviti da upravo oni daju visoku koagulacionu aktivnost supernatantu. Takođe, pasulj sadrži izvestan procenat rastvorljivih vlakana, čiji je čest konstituent galakturonska kiselina u svom polimerizovanom obliku (poligalakturonska kiselina), a ona se smatra visoko aktivnom u smislu koagulacije/flokulacije.

U pogledu uticaja na sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi, sirovi ekstrakt pasulja i supernatant dobijen nakon taloženja proteina iz sirovog ekstrakta su doveli do gotovo istog povećanja sadržaja organskih materija od oko 50%, dok se nakon primene dijalizata sadržaj organskih materija nije značajnije povećao. S druge strane, svih šest frakcija dobijenih kolonskom hromatografijom su dovele do značajnog (oko 70%) smanjenja sadržaja organskih materija u tretiranoj vodi. Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti da se prečišćavanjem sirovog ekstrakta pasulja metodom isoljavanja proteina poboljšava njegova koagulaciona aktivnost, a problem velikog povećanja sadržaja organskih materija nakon koagulacije, uveliko prevazilazi. Daljim prečišćavanjem proteina iz dijalizata njihovim fracionisanjem jonoizmenjivačkom hromatografijom na Amberlite™ IRA 900Cl dobijaju se prečišćene frakcije koje zadržavaju odličnu koagulacionu aktivnost i ne povećavaju sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi, već ga, naprotiv, značajno snižavaju.

- Koagulaciona aktivnost sirovog vodenog ekstrakta pasulja u model vodi pri optimalnim uslovima (početna mutnoća i pH model vode 220 NTU i 5,5, respektivno, i doza sirovog ekstrakta pasulja 0,4 ml/l), određenim primenom metode odzivne površine, je iznosila 88,5%. Međutim, sirovi ekstrakt je istovremeno



povećavao sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi za 66,05%. Kako bi se iz sirovog ekstrakta uklonile materije koje nemaju koagulacionu aktivnost, a doprinose sadržaju organskih materija u obrađenoj vodi, on je frakcionisan ultrafiltracijom. Na taj način su dobijene četiri frakcije: I frakcija  $M < 5$  kDa, II frakcija  $5 < M < 10$  kDa, III frakcija  $10 < M < 30$  kDa i IV frakcija  $M > 30$  kDa. Ove frakcije su zatim bile primenjene kao koagulanti u model vodi pri istim uslovima kao sirovi ekstrakt. I, II, pa čak i III frakcija su pokazale nisku koagulacionu aktivnost, dok je IV frakcija postigla visoku efikasnost uklanjanja mutnoće, blisku onoj koju je pokazao sirovi ekstrakt od koga su frakcije dobijene. Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da su glavni nosioci koagulacione aktivnosti u sirovom ekstraktu pasulja molekuli čija je molekulska masa iznad 30 kDa, dok molekuli nižih molekulskih masa ne poseduju značajniju sposobnost uklanjanja suspendovanih čestica.

Kako bi se maksimizovala koagulaciona aktivnost IV frakcije, izvedena je optimizacija procesnih parametara primenom metode odzivne površine, a kao optimalni uslovi utvrđeni su: početna mutnoća model vode 220 NTU, pH vrednost 5,5, i doza IV frakcije 0,9 ml/l. Pri ovim uslovima, IV frakcija je postigla koagulacionu aktivnost od 79,8%, što je u odnosu na koagulacionu aktivnost sirovog ekstrakta pasulja niže samo za 9,8%. Istovremeno, IV frakcija je mnogo manje uticala na sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi u odnosu na sirovi ekstrakt, povećavši ga za 16,04%.

- Izdvajanje nepolarnih materija iz zrna pasulja nema značajniji uticaj na efikasnost bistrenja ekstraktima koji se nakon toga dobijaju iz pasulja, što se može objasniti malim sadržajem lipida u ispitivanoj sorti pasulja (1,44%). Stoga, nije potreban korak delipidacije pre ekstrakcije kako bi se izdvojile lipidne materije, što svakako predstavlja prednost i sa ekonomskog i sa aspekta zaštite životne sredine u odnosu na neke druge izvore prirodnih koagulanata, kao što je *Moringa oleifera*, kod kojih je delipidacija neophodan korak pre ekstrakcije prirodnih koagulanata.
- Na osnovu rezultata vezanih za frakcionisanje i prečišćavanje prirodnih koagulanata iz zrna pasulja može se zaključiti da se od metoda razmatranih u okviru rada najbolji rezultati postižu:
  - a) taloženjem proteina isoljavanjem, dijalizom taloga i zatim frakcionisanjem proteina dijalizata jonoizmenjivačkom hromatografijom,
  - b) taloženjem proteina isoljavanjem i zatim dijalizom taloga i
  - c) ultrafiltracijom na membrani sa MWCO vrednošću 30000 Da.

Sve ostale metode prečišćavanja i frakcionisanja nisu dale dovoljno dobre rezultate, bilo sa aspekta uklanjanja mutnoće, bilo sa aspekta uticaja na sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi. Jasno je da se daleko najbolji rezultati postižu kombinacijom metoda prečišćavanja pod a), međutim ovaj postupak može biti skup za pripremu većih količina prirodnih koagulanata, te stoga treba uzeti u obzir i metode pod b) i c) kao opcije za prečišćavanje. Što se tiče ove dve metode, nešto bolji rezultati se postižu taloženjem proteina i dijalizom taloga, ali ne sme se smetnuti s uma da se taloženje izvodi dodatkom značajne količine amonijum-sulfata, koji se zatim iz taloga uklanja dijalizom. Kod pripreme većih količina koagulanata to može biti nepoželjno sa ekološke strane. Dakle, može se zaključiti da je prečišćavanje sirovog ekstrakta svakako poželjno kao korak u pripremi prirodnog koagulanata dobijenog iz zrna pasulja, ali za konačan izbor metode prečišćavanja

potrebno je uraditi detaljnu analizu predloženih postupaka, kako sa ekonomskog, tako i sa ekološkog stanovišta.

- Ispitivanjem uticaja različitih jona na koagulacionu aktivnost sirovog ekstrakta pasulja u model vodi, utvrđeno je da je neophodno prisustvo dvovalentnih katjona da bi se odvijala koagulacija, odnosno u prisustvu samo jednovalentnih katjona, koagulacija izostaje. S obzirom na izoelektrične tačke suspenzije kaolina i sirovog ekstrakta pasulja (2,56 i 3,61, respektivno), i pH vrednosti na kojima su izvedena ispitivanja (pH 5,5 i pH 11), može se pretpostaviti mehanizam koagulacije: dvovalentni katjoni su neophodni kao posrednici za obrazovanje veza bilo između negativno naelektrisanih molekula koagulanta i negativno naelektrisanih čestica kaolina, kada se koagulacija odvija po mehanizmu povezivanja mostovima, bilo između samih negativno naelektrisanih molekula koagulanta, kada se obrazuje mrežasta struktura u koju se „hvataju“ čestice kaolina, pa se koagulacija odvija po mehanizmu *sweep* koagulacije. Takođe, na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da su dominantni koagulanti u ekstraktu pasulja anjonski polielektroliti.
- Primenom sirovog ekstrakta pasulja za obradu otpadnih voda od proizvodnje bioetanola fermentacijom na različitim hranljivim podlogama pripremljenim od međuproizvoda i nusproizvoda proizvodnje šećera (ekstrakcioni sok, retki sok, gusti sok i melasa), utvrđeno je da se na ovaj način u otpadnoj vodi od proizvodnje bioetanola na podlozi od ekstrakcionog soka i melase postiže smanjenje HPK od 68,8% i 60%, respektivno. U otpadnoj vodi od proizvodnje bioetanola na podlozi od retkog i gustog soka sirovi ekstrakt pasulja je postigao slabo smanjenje HPK, oko 15%. Poređenjem rezultata dobijenih za primenu ekstrakta pasulja za smanjenje sadržaja organskih materija u ispitivanim džibrama sa učinkom centrifugiranja kao metode njihove obrade, može se zaključiti da se prirodni koagulanti ekstrahovani iz pasulja mogu uspešno primeniti umesto centrifugiranja za obradu džibre ekstrakcionog soka i melasne džibre.
- Ispitivanjem mogućnosti primene sirovog ekstrakta pasulja kao pomoćnog koagulanta aluminijum-sulfatu u obradi model vode početne mutnoće 35 NTU, utvrđeno je da na pH 7,3 pri nižim primenjenim dozama aluminijum-sulfata (12,8 mg/l i 25,7 mg/l) dodatak sirovog ekstrakta povećava koagulacionu aktivnost za oko 15%. Pri većoj dozi aluminijum-sulfata (128,4 mg/l), njegova koagulaciona aktivnost je već dosta visoka, pa dodatak ekstrakta pasulja samo neznatno povećava koagulacionu aktivnost. Primenom ekstrakta pasulja kao pomoćnog koagulanta se doza aluminijum-sulfata može smanjiti za 50% (sa 25,7 mg/l na 12,8 mg/l), a da se postigne približno jednaka efikasnost bistrenja.
- Ispitivanjem hemijskog sastava pasulja i ostataka pasulja nakon ekstrakcije prirodnih koagulanata destilovanom vodom i 0,5 mol/l rastvorom NaCl, utvrđeno je da određena količina proteina zaostaje u pasulju nakon ekstrakcije, što ovakav pasulj svakako čini pogodnim kao dodatak stočnoj hrani, a prisustvo nerastvorljivih vlakana bi povoljno uticalo na digestivni trakt kako preživara, tako i životinja koje nisu preživari. Stoga, pasulj zaostao nakon ekstrakcije sa destilovanom vodom može biti korišćen kao dodatak stočnoj hrani, što bi predstavljalo dodatnu vrednost postupka dobijanja prirodnih koagulanata, a pasulj nakon ekstrakcije sa rastvorom NaCl bi trebalo dodatno ispitati kako bi se utvrdio sadržaj soli, odnosno da li je on toliki da bi onemogućavao primenu ovog ostatka pasulja kao dodatka stočnoj hrani.

## 6. LITERATURA

1. AACC: AACC Method 32-07: Determination of soluble, insoluble and total dietary fiber in foods and food products, in: Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th ed., The Association, St. Paul, MN, USA, (1995).
2. Adamović S.: Bistrenje vode primenom prirodnog koagulanta iz semena pasulja, magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (2010).
3. Adinolfi M., Corsaro M.M., Lanzetta R., Parrilli M., Folkard G., Grant W., Sutherland J.: Composition of the coagulant polysaccharide fraction from *Strychnos potatorum* seeds, Carbohydrate Research, **263**, (1994), 103-110.
4. Alfrey A.C.: Aluminium and renal disease, Contributions to Nephrology, **102**, (1993a), 110-124.
5. Alfrey A.C.: Aluminium toxicity in patients with chronic renal failure, Therapeutic Drug Monitoring, **15**, (1993b), 593-597.
6. Amersham Biosciences, Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods, [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/IonExchange/AMERSHAM\\_iIEXandChromatofocManual.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/IonExchange/AMERSHAM_iIEXandChromatofocManual.pdf) (posećena 18. aprila 2014.).
7. Anderson G.J.: Mechanism of iron loading and toxicity, American Journal of Hematology, **82**, (2007), 1128-1131.
8. Antov M.G., Šćiban M.B., Petrović N.J.: Proteins from common bean (*Phaseolus vulgaris*) seed as a natural coagulant for potential application in water turbidity removal, Bioresource Technology, **101**, (2010), 2167-2172.
9. APHA: Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington DC, (1998).
10. Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E.: Role of metals in oxygen radical reactions, Journal of Free Radicals in Biology and Medicine, **1**, (1985), 3-25.
11. Becaria A., Lahiri D.K., Bondy S.C., Chen D.-M., Hamadeh A., Li H., Taylor R., Campbell A.: Aluminium and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain, Journal of Neuroimmunology, **176**, (2006), 16-23.
12. Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J.: Azo dye removal by *Moringa oleifera* seed extract coagulation, Coloration Technology, **124**, (2008), 310-317.
13. Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J.: Removal of sodium lauryl sulphate by coagulation/flocculation with *Moringa oleifera* seed extract, Journal of Hazardous Materials, **164**, (2009a), 713-719.
14. Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J.: Removing heavy metals from polluted surface water with a tannin-based flocculant agent, Journal of Hazardous Materials, **165**, (2009b), 1215-1218.
15. Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J., Delgado-Regalado A.: Removal of Carmine Indigo dye with *Moringa oleifera* seed extract, Industrial and Engineering Chemistry Research, **48**, (2009a), 6512-6520.

16. Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J., Delgado-Regalado A., Jurado-Bustos C.: Removal of Alizarin Violet 3R (anthraquinonic dye) from aqueous solutions by natural coagulants, *Journal of Hazardous Materials*, **170**, (2009b), 43-50.
17. Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J., Solera-Hernández C.: Removal of sodium dodecyl benzene sulfonate from water by means of a new tannin-based coagulant: Optimisation studies through design of experiments, *Chemical Engineering Journal*, **153**, (2009), 56-61.
18. Berg D., Gerlach M., Youdim M.B.H., Double K.L., Zecca L., Riederer P., Becker G.: Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease, *Journal of Neurochemistry*, **79**, (2001), 225-236.
19. Bhatia S., Othman Z., Ahmad A.L.: Coagulation-flocculation process for POME treatment using *Moringa oleifera* seeds extract: Optimization studies, *Chemical Engineering Journal*, **133**, (2007a), 205-212.
20. Bhatia S., Othman Z., Ahmad A.L.: Pretreatment of palm oil mill effluent (POME) using *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant, *Journal of Hazardous Materials*, **145**, (2007b), 120-126.
21. Bhuptawat H., Folkard G.K., Chaudhari S.: Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant, *Journal of Hazardous Materials*, **142**, (2007), 477-482.
22. Blackburn R.S.: Natural polysaccharides and their interactions with dye molecules: applications in effluent treatment, *Environmental Science and Technology*, **38**, (2004), 4905-4909.
23. Bolto B., Gregory J.: Organic polyelectrolytes in water treatment, *Water Research*, **41**, (2007), 2301-2324.
24. Bondy S.C.: The neurotoxicity of environmental aluminium is still an issue, *Neurotoxicology*, **31**, (2010), 575-581.
25. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, (1976), 248-254.
26. Cerruti P.A.: Prooxidant states and tumor promotion, *Science*, **227**, (1985), 375-381.
27. Chandrasekaran V.R.M., Muthaiya I., Huang P.-C., Liu M.-Y.: Using iron precipitants to remove arsenic from water: Is it safe?, *Water Research*, **4**, (2010), 5823-5827.
28. Chico Galdo V., Massart C., Jin L., Vanvooren V., Caillet-Fauquet P., Andry G., Lothaire P., Dequanter D., Friedman M., Van Sande J.: Acrylamide, an in vivo thyroid carcinogenic agent, induces DNA damage in rat thyroid cell lines and primary cultures, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **257-258**, (2006), 6-14.
29. Chow C.W.K., Drikas M., House J., Burch M.D., Velzeboer R.M.A.: The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Water Research*, **33**, (1999), 3253-3262.
30. Corsaro M.M., Giudicianni I., Lanzetta R., Marciano C.E., Monaco P., Parrilli M.: Polysaccharides from seeds of *Strychnos* species, *Phytochemistry*, **39**, (1995), 1377-1380.
31. Crapper D.R., Krishnan S.S., Dalton A.J.: Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration, *Science*, **180**, (1973), 511-513.

32. Crittenden J.C., Trussell R.R., Hand D.W., Howe K.J., Tchobanoglous G.: Water treatment principles and design, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, (2012).
33. Davison A.M., Oli H., Walker G.S., Lewins A.M.: Water supply aluminium concentration, dialysis dementia, and effect of reverse-osmosis water treatment, *The Lancet*, **320**, (1982), 785-787.
34. Diaz A., Rincon E., Escorihuela A., Fernandez N., Chacin E., Forster C.F.: A preliminary evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela, *Process Biochemistry*, **35**, (1999), 391-395.
35. Doll R.: Review: Alzheimer's disease and environmental aluminium, *Age and Ageing*, **22**, (1993), 138-153.
36. Dörries S.C.: Coagulants of *Moringa oleifera* Lam. seeds. Purification and characterization, PhD Thesis, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, (2005).
37. Duan J., Gregory J.: Coagulation by hydrolysing metal salts, *Advances in Colloid and Interface Science*, **100-102**, (2003), 475-502.
38. Flaten T.P.: Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water, *Brain Research Bulletin*, **55**, (2001), 187-196.
39. Folkard G., Sutherland J.: Development of a naturally derived coagulant for water and wastewater treatment, *Water Science and Technology: Water Supply*, **2**, (2002), 89-94.
40. Ghebremichael K., Abaliwano J., Amy G.: Combined natural organic and synthetic inorganic coagulants for surface water treatment, *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*, **58**, (2009), 267-276.
41. Ghebremichael K.A., Gunaratna K.R., Dalhammar G.: Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70**, (2006), 526-532.
42. Ghebremichael K.A., Gunaratna K.R., Henriksson H., Brumer H., Dalhammar G.: A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed, *Water Research*, **39**, (2005), 2338-2344.
43. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease, *Human Toxicology*, **7**, (1988), 7-13.
44. Hamilton J.D., Reinert K.H., Freeman M.B.: Aquatic risk assessment of polymers, *Environmental Science and Technology*, **28**, (1994), A187-A192.
45. Haug W., Lantsch H.-J.: Sensitive method for rapid determination of phytate in cereals and cereal products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **34**, (1983), 1423-1426.
46. Hedemann M.S., Eskildsen M., Laerke H.N., Pedersen C., Lindberg J.E., Laurinen P., Bach Knudsen K.E.: Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties, *Journal of Animal Science*, **84**, (2006), 1375-1386.
47. Henke S., Bubník Z., Hinková A., Pour V.: Model of a sugar factory with bioethanol production in program Sugars<sup>TM</sup>, *Journal of Food Engineering*, **77**, (2006), 416-420.

48. Jahn S.A.A.: Using *Moringa* seeds as coagulants in developing countries, Journal of the American Water Works Association, **80**, (1988), 43-50.
49. Jeon J.-R., Kim E.-J., Kim Y.-M., Murugesan K., Kim J.-H., Chang Y.-S.: Use of grape seed and its natural polyphenol extracts as a natural organic coagulant for removal of cationic dyes, Chemosphere, **77**, (2009), 1090-1098.
50. Katayon S., Megat Mohd Noor M.J., Asma M., Abdul Ghani L.A., Thamer A.M., Azni I., Ahmad J., Khor B.C., Suleyman A.M.: Effect of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation, Bioresource Technology, **97**, (2006), 1455-1460.
51. Krčmar M., Pasulj – uzgoj, tehnološka zrelost, berba i skladištenje, <http://www.tehnologijahrane.com/tehnologijavoca-i-povrca/pasulj> (posećena 25. septembra 2014.).
52. Lepojević Ž.: Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda, ITP Zmaj Novi Sad i Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, (2000).
53. Martyn C.N., Osmond C., Edwardson J.A., Barker D.J.P., Harris E.C., Lacey R.F.: Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water, Lancet, **333**, (1989), 61-62.
54. McLachlan D.R.C.: Aluminium and the risk for Alzheimer's disease, Environmetrics, **6**, (1995), 233-275.
55. MEBAK: Brautechnische Analysenmethoden, Bd. I. MEBAK, Freising-Weihenstephan, (1997).
56. Miller S.M., Fugate E.J., Craver V.O., Smith J.A., Zimmerman J.B.: Toward understanding the efficacy and mechanism of *Opuntia spp.* as a natural coagulant for potential application in water treatment, Environmental Science and Technology, **42**, (2008), 4274-4279.
57. Minotti G., Aust S.D.: The role of iron in the initiation of lipid peroxidation, Chemistry and Physics of Lipids, **44**, (1987), 191-208.
58. Mohana S., Acharya B.K., Madamwar D.: Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications, Journal of Hazardous Materials, **163**, (2009), 12-25.
59. Montagne L., Pluske J.R., Hampson D.J.: A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals, Animal Feed Science and Technology, **108**, (2003), 95-117.
60. Montoya C.A., Laterme P., Beebe S., Souffrant W.B., Molle D., Lalles J.-P.: Phaseolin type and heat treatment influence the biochemistry of protein digestion in the rat intestine, British Journal of Nutrition, **99**, (2008), 531-539.
61. Muyibi S.A., Alfugara A.M.S.: Treatment of surface water with *Moringa oleifera* seed extract and alum – a comparative study using a pilot scale water treatment plant, International Journal of Environmental Studies, **60**, (2003), 617-626.
62. Muyibi S.A., Evison L.M.: Coagulation of turbid water and softening of hard water with *Moringa oleifera* seeds, International Journal of Environmental Studies, **49**, (1996), 247-259.
63. Muyibi S.A., Evison L.M.: *Moringa oleifera* seeds for softening hardwater, Water Research, **29**, (1995a), 1099-1104.

64. Muyibi S.A., Evison L.M.: Optimizing physical parameters affecting coagulation of turbid water with *Moringa oleifera* seeds, *Water Research*, **29**, (1995b), 2689-2695.
65. Muyibi S.A., Noor M.J.M.M., Tan K.L., Lam H.L.: Effects of oil extraction from *Moringa oleifera* seeds on coagulation of turbid water, *International Journal of Environmental Studies*, **59**, (2002), 243-254.
66. Muyibi S.A., Okuofu C.A.: Coagulation of low turbidity surface water with *Moringa oleifera* seeds, *International Journal of Environmental Studies*, **48**, (1995), 263-273.
67. Narasiah K.S., Vogel A., Kramadhathi N.N.: Coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera* seeds from two distinct sources, *Water Science and Technology*, **2**, (2002), 83-88.
68. Ndabigengesere A., Narasiah K.S.: Influence of operating parameters on turbidity removal by coagulation with *Moringa oleifera* seeds, *Environmental Technology*, **17**, (1996), 1103-1112.
69. Ndabigengesere A., Narasiah K.S.: Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds, *Water Research*, **32**, (1998a), 781-791.
70. Ndabigengesere A., Narasiah K.S., Talbot B.G.: Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*, *Water Research*, **29**, (1995), 703-710.
71. Ndabigengesere A., Narasiah K.S.: Use of *Moringa oleifera* seeds as a primary coagulant in wastewater treatment, *Environmental Technology*, **19**, (1998b), 789-800.
72. Nieboer E., Gibson B.L., Oxman A.D., Kramer J.R.: Health effects of aluminium: a critical review with emphasis on aluminium in drinking water, *Environmental Reviews*, **3**, (1995), 29-81.
73. NIST/SEMATECH, NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/> (posećena 21. aprila 2014.).
74. Nkurunziza T., Nduwayezu J.B., Banadda E.N., Nhapi I.: The effect of turbidity levels and *Moringa oleifera* concentration on the effectiveness of coagulation in water treatment, *Water Science and Technology*, **59**, (2009), 1551-1558.
75. Okuda T., Baes A.U., Nishijima W., Okada M.: Coagulation mechanism of salt solution extracted active components in *Moringa oleifera* seeds, *Water Research*, **35**, (2001a), 830-834.
76. Okuda T., Baes A.U., Nishijima W., Okada M.: Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed, *Water Research*, **33**, (1999), 3373-3378.
77. Okuda T., Baes A.U., Nishijima W., Okada M.: Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution, *Water Research*, **35**, (2001b), 405-410.
78. Olsen A.: Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seed flocculation as performed in sudanese villages: effects on *Schistosoma mansoni* cercariae, *Water Research*, **21**, (1987), 517-522.
79. Omar F.M., Rahman N.N.N.A., Ahmad A.: COD reduction in semiconductor wastewater by natural and commercialized coagulants using Response Surface Methodology, *Water, Air, and Soil Pollution*, **195**, (2008), 345-352.

80. Özacar M., Şengil I.A.: Effectiveness of tannins obtained from valonia as a coagulant aid for dewatering of sludge, *Water Research*, **34**, (2000), 1407-1412.
81. Pal S., Mal D., Singh R.P.: Cationic starch: an effective flocculating agent, *Carbohydrate Polymers*, **59**, (2005), 417-423.
82. Petrov S.: Hemijski sastav šećerne repe, u: *Osnovi tehnologije šećera*, Šušić S., Koronovac B., Svorcan R. (urednici), Industrija šećera SR Jugoslavije „Jugošećer“ d.d., Beograd, (1994), 49-93.
83. Poddar S., Talukder G., Sharma A.: Chromosome damaged induced by ferric chloride in human peripheral lymphocytes, *International Journal of Human Genetics*, **4**, (2004), 261-264.
84. Popov S., Ranković J., Dodić J., Dodić S., Jokić A.: Bioethanol production from raw juice as intermediate of sugar beet processing: A response surface methodology approach, *Food Technology and Biotechnology*, **48**, (2010), 376-383.
85. Prasad R.K.: Color removal from distillery spent wash through coagulation using *Moringa oleifera* seeds: Use of optimum response surface methodology, *Journal of Hazardous Materials*, **165**, (2009), 804-811.
86. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća, Službeni list SFRJ 29, (1983).
87. Pritchard M., Craven T., Mkandawire T., Edmondson A.S., O'Neill J.G.: A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water – An alternative sustainable solution for developing countries, *Physics and Chemistry of the Earth*, **35**, (2010a), 798-805.
88. Pritchard M., Craven T., Mkandawire T., Edmondson A.S., O'Neill J.G.: A study of the parameters affecting the effectiveness of *Moringa oleifera* in drinking water purification, *Physics and Chemistry of the Earth*, **35**, (2010b), 791-797.
89. Pritchard M., Mkandawire T., Edmondson A., O'Neill J.G., Kululanga G.: Potential of using plant extracts for purification of shallow well water in Malawi, *Physics and Chemistry of the Earth*, **34**, (2009), 799-805.
90. Qin J.-J., Oo M.H., Kekre K.A., Knops F., Miller P.: Impact of coagulation pH on enhanced removal of natural organic matter in treatment of reservoir water, *Separation and Purification Technology*, **49**, (2006), 295-298.
91. Sánchez-Martín J., Ghebremichael K., Beltrán-Heredia J.: Comparison of single-step and two-step purified coagulants from *Moringa oleifera* seed for turbidity and DOC removal, *Bioresource Technology*, **101**, (2010), 6259-6261.
92. Sánchez-Martín J., González-Velasco M., Beltrán-Heredia J.: Surface water treatment with tannin-based coagulants from *Quebracho* (*Schinopsis balansae*), *Chemical Engineering Journal*, **165**, (2010b), 851-858.
93. Sanghi R., Bhattacharya B., Dixit A., Singh V.: *Ipomoea dasysperma* seed gum: an effective natural coagulant for the decolorization of textile dye solutions, *Journal of Environmental Management*, **81**, (2006a), 36-41.
94. Sanghi R., Bhattacharya B., Singh V.: *Cassia angustifolia* seed gum as an effective natural coagulant for decolourisation of dye solutions, *Green Chemistry*, **4**, (2002), 252-254.



95. Sanghi R., Bhattacharya B., Singh V.: Use of *Cassia javahikai* seed gum and gum-g-polyacrylamide as coagulant aid for the decolorization of textile dye solutions, *Bioresource Technology*, **97**, (2006b), 1259-1264.
96. Sato M., Furukawa F., Toyoda K., Mitsumori K., Nishikawa A., Takahashi M.: Lack of carcinogenicity of ferric chloride in F344 rats, *Food and Chemical Toxicology*, **30**, (1992), 837-842.
97. Savory J., Exley C., Forbes W.F., Huang Y., Joshi J.G., Kruck T., McLachlan D.R., Wakayama I.: Can the controversy of the role of aluminium in Alzheimer's disease be resolved? What are the suggested approaches to this controversy and methodological issues to be considered?, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **48**, (1996), 615-635.
98. Sáenz C., Sepúlveda E., Matsuhira B.: *Opuntia spp* mucilage's: a functional component with industrial perspectives, *Journal of Arid Environments*, **57**, (2004), 275-290.
99. Siah C.W., Trinder D., Olynyk J.K.: Iron overload, *Clinica Chimica Acta*, **358**, (2005), 24-36.
100. Sotero-Santos R.B., Rocha O., Povinelli J.: Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms, *Chemosphere*, **68**, (2007), 628-636.
101. Stevens R.G., Jones Y., Micozzi M.S., Taylor P.R.: Body iron stores and the risk of cancer, *New England Journal of Medicine*, **319**, (1988), 1047-1052.
102. Sutherland J., *M. oleifera* in Water Treatment, [www.le.ac.uk/engineering/staff/Sutherland/moringa/moringa.htm](http://www.le.ac.uk/engineering/staff/Sutherland/moringa/moringa.htm) (posećena 22. maja 2012.).
103. Šćiban M., Antov M., Prodanović J.: Ispitivanje koagulacione aktivnosti prirodnih koagulanata iz semena pasulja, soje i sojine sačme, XVII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, 21. mart 2009., Beograd, Srbija, Zbornik radova, 190-193.
104. Šćiban M., Klačnja M., Antov M., Škrbić B.: Removal of water turbidity by natural coagulants obtained from chestnut and acorn, *Bioresource Technology*, **100**, (2009), 6639-6643.
105. Šćiban M., Klačnja M., Stojimirović J.: Investigation of coagulation activity of natural coagulants from seeds of different Leguminose species, *Acta Periodica Technologica*, **36**, (2005), 81-87.
106. Tepić A., Vujičić B., Vasić M., Lučić A.: Amino acids and phytic acids in some Serbian varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*), 2<sup>nd</sup> International Congress on Food and Nutrition, 24. – 26. October 2007., Istanbul, Turkey, Book of abstracts, 180.
107. Trachtenberg S., Mayer A.M.: Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage, *Phytochemistry*, **20**, (1981), 2665-2668.
108. Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje, Službeni glasnik RS 67, (2011) i 48, (2012).
109. Voda za piće – Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti, Feliks R., Škunca-Milovanović S. (urednici), Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu & NIP Privredni pregled, Beograd, (1990).
110. Walton J.R., Wang M.-X.: APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminium in a rodent model for Alzheimer's disease, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, (2009), 1548-1554.

111. Waterhouse A.L.: Determination of total phenolics, In: Current protocols in food analytical chemistry, Wrolstad E.R., Acree E.T., Haejung A., Decker A.E., Penner H.M., Reid S.D., Schwartz J.S., Shoemaker J.S., Smith M.D., Sporns P., John Wiley and Sons, Inc., (2002), I 1.1.1-I 1.1.8.
112. Weinberg E.D.: Iron withholding: a defense against infection and neoplasia, *Physiological Reviews*, **64**, (1984), 65-102.
113. Wilkie A.C., Riedesel K.J., Owens J.M.: Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, *Biomass and Bioenergy*, **19**, (2000), 63-102.
114. Wrolstad R.E.: Current protocols in food analytical chemistry, John Wiley and Sons, Inc., (2001), D1.1.1.-D1.1.11, Contributed by Fereidoon Shahidi.
115. Yin C.-Y.: Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment, *Process Biochemistry*, **45**, (2010), 1437-1444.
116. Young K., Anzalone A., Alcantar N.: Using the Mexican cactus as a natural-based process for removing contaminants in drinking water, *Polymeric Materials: Science & Engineering*, **93**, (2005), 965-966.
117. Zahrim A.Y., Tizaoui C., Hilal N.: Coagulation with polymers for nanofiltration pre-treatment of highly concentrated dyes: A review, *Desalination*, **266**, (2011), 1-16.
118. Zeković Z.: Ekstrakcija timijana (*Thymus vulgaris L.*) superkritičnim ugljendioksidom, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (1998).
119. Zhang J., Zhang F., Luo Y., Yang H.: A preliminary study on cactus as coagulant in water treatment, *Process Biochemistry*, **41**, (2006), 730-733.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Prodanović, dipl. inž.
Mentor: MN	Dr Marina Šćiban, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	<b>Prirodni koagulanti iz zrna pasulja (<i>Phaseolus vulgaris</i>) u obradi vode</b>
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski (latinica) / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja, 157 stranica, 95 slika, 32 tabele, 119 referenci
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo

Naučna disciplina: ND	Tehnologija vode i otpadnih voda
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Voda, koagulacija/flokulacija, prirodni koagulant, pasulj
UDK	628.35:541.18.04:635.652(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21 000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Srbija
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita mogućnost dobijanja prirodnih koagulanata iz zrna pasulja koji bi se koristili u obradi različitih voda i otpadnih voda. U okviru izvedenih eksperimenata su utvrđeni najbolji uslovi za ekstrakciju prirodnih koagulanata iz pasulja, određen je hemijski sastav sirovih ekstrakata dobijenih na različite načine, proverena je trajnost i određen način čuvanja sirovih ekstrakata i ispitan uticaj različitih parametara na koagulacionu aktivnost sirovih ekstrakata.</p> <p>S obzirom na to da su prirodni koagulant organskog porekla, oni povećavaju sadržaj organskih materija u tretiranoj vodi, pa su u okviru rada ispitane i upoređene različite metode prečišćavanja sirovog ekstrakta pasulja, a zatim određen uticaj sirovog ekstrakta i prečišćenih koagulanata na sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi.</p> <p>Kako bi se ispitala efikasnost prirodnih koagulanata iz zrna pasulja u realnim vodama, oni su bili primenjeni u otpadnim vodama od proizvodnje bioetanola. Pored toga, ispitana je mogućnost njihove primene u kombinaciji sa konvencionalnim koagulantima, i na samom kraju je ispitan sastav pasulja koji preostane nakon ekstrakcije prirodnih koagulanata kako bi se utvrdilo da li je pogodan za korišćenje kao dodatak stočnoj hrani.</p> <p>Dobijeni rezultati su pokazali da se iz zrna pasulja može dobiti ekstrakt visoke koagulacione aktivnosti, koji se dalje može efikasno prečistiti tako da ne povećava sadržaj organskih materija u obrađenoj vodi, već ga naprotiv smanjuje. Takođe, prirodni koagulant</p>

	iz pasulja se mogu uspešno primeniti za tretman otpadnih voda od proizvodnje bioetanola, mogu biti pomoćni koagulanti aluminijum-sulfatu, a pasulj nakon ekstrakcije prirodnih koagulanata sa destilovanom vodom se može iskoristiti kao dodatak stočnoj hrani.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	19.04.2013.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>predsednik: dr Mile Klašnja, redovni profesor, Biotehnologija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član-mentor: dr Marina Šćiban, redovni profesor, Biotehnologija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Mirjana Antov, redovni profesor, Biotehnologija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor, Biotehnologija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd</p>

**University of Novi Sad**  
**Faculty of Technology**  
**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	Jelena Prodanović
Mentor: MN	Marina Šćiban, PhD, Full Professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad
Title: TI	<b>Natural coagulants from common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) in water treatment</b>
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian (latin) / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21 000 Novi Sad, Blvd. Cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters, 157 pages, 95 figures, 32 tables, 119 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Water and wastewater technology

Subject, Key words SKW	Water, coagulation/flocculation, natural coagulants, common bean
UC	628.35:541.18.04:635.652(043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21 000 Novi Sad, Blvd. Cara Lazara 1, Serbia
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The aim of this PhD thesis was to investigate the possibility to obtain natural coagulants from common bean which could be used for different waters and wastewaters treatment. The optimal conditions for extraction of natural coagulants from common bean, the chemical composition of crude extracts obtained in different ways and the influence of various parameters on coagulation activity of crude extracts were determined within the performed experiments. The durability of crude extracts was checked and the way of their storage defined.</p> <p>Considering the fact that natural coagulants are of organic origin, they increase the content of organic matter in treated water. Hence, the different methods of purification of common bean crude extract were investigated and compared, and thereafter the influence of crude extract and purified coagulants on organic matter content in treated water was determined.</p> <p>Natural coagulants obtained from common bean were applied in bioethanol stillages in order to explore their efficiency in real waters. Besides, the possibility of their usage combined with conventional coagulants was investigated. At the end, the composition of common bean that remains after extraction of natural coagulants was determined in order to to prove if it was appropriate as addition to feed.</p> <p>Obtained results showed that extract of high coagulation activity can be obtained from common bean. It can be efficiently purified so as not to increase the organic matter content of the water, but on the contrary, to decrease it. Natural coagulants from common bean can be successfully applied for treatment of wastewaters remained after bioethanol production, they can be used as coagulant aid</p>

	with alum, and the common bean remained after extraction of natural coagulants with distilled water can be utilized as addition to feed.
Accepted on Senate on: AS	19.04.2013.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Mile Klašnja, PhD, Full Professor, Biotechnology, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member-mentor: Marina Šćiban, PhD, Full Professor, Biotechnology, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: Mirjana Antov, PhD, Full Professor, Biotechnology, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: Zorica Knežević-Jugović, PhD, Full Professor, Biotechnology, University of Belgrade, Faculty of Technology and metallurgy Beograd</p>