



**ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД
СТУДИЈСКИ ПРОГРАМ • BIOTEХНОЛОГИЈА
НАУЧНА ОБЛАСТ • ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Бојана Бајић, дипл. инж.

**МОДЕЛ БИОПРОЦЕСА ПРОИЗВОДЊЕ КСАНТАНА НА
ЕФЛУЕНТИМА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ**

докторска дисертација

НОВИ САД • 2016

САДРЖАЈ

СПИСАК ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА.....	IV
СПИСАК СЛИКА	V
СПИСАК ТАБЕЛА.....	IX
1. УВОД	1
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	3
3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	5
3.1. ЕФЛУЕНТИ ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ КАО СИРОВИНЕ У БИОТЕХНОЛОШКОЈ ПРОИЗВОДЊИ.....	6
3.1.1. ОТПАДНЕ ВОДЕ ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ.....	6
3.1.2. КАРАКТЕРИСТИКЕ ОТПАДНИХ ВОДА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ.....	9
3.1.3. КРИТЕРИЈУМИ ИЗБОРА ОТПАДНИХ ВОДА ЗА ИНДУСТРИЈСКЕ КУЛТИВАЦИОНЕ МЕДИЈУМЕ.....	12
3.1.4. МОГУЋНОСТ ПРИМЕНЕ ОТПАДНИХ ВОДА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ ЗА ДОБИЈАЊЕ ТРЖИШНО ВРЕДНИХ БИОПРОИЗВОДА И БИОЕНЕРГЕНАТА.....	13
3.1.5. ОТПАДНЕ ВОДЕ ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ АП ВОЈВОДИНЕ.....	14
3.2. БИОТЕХНОЛОШКА ПРОИЗВОДЊА КСАНТАНА.....	16
3.2.1. ПРОИЗВОДНИ МИКРООРГАНИЗАМ.....	16
3.2.2. САСТАВ ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ.....	17
3.2.3. ПРОИЗВОДНИ ПОСТУПАК И ТЕХНИЧКО-ТЕХНОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ ПРОИЗВОДЊЕ КСАНТАНА.....	20
3.2.4. ИЗДВАЈАЊЕ И ПРЕЧИШЋАВАЊЕ ПРОИЗВОДА.....	22
3.2.5. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛА И ОСОБИНЕ РАСТВОРА КСАНТАНА.....	22
3.2.6. ПРИМЕНА БИОПОЛИМЕРА КСАНТАНА.....	24
3.3. МОДЕЛОВАЊЕ И СИМУЛАЦИЈА БИОПРОЦЕСА.....	25
3.3.1. МАТЕМАТИЧКО МОДЕЛОВАЊЕ.....	27
3.3.2. СИМУЛАЦИЈА БИОПРОЦЕСА.....	30
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	35
4.1. ПРОИЗВОДНИ МИКРООРГАНИЗАМ.....	36
4.2. ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ И КУЛТИВАЦИОНИ МЕДИЈУМИ.....	36
4.3. ПРИПРЕМА ИНОКУЛУМА.....	38
4.4. УСЛОВИ БИОСИНТЕЗЕ.....	38
4.5. ИЗДВАЈАЊЕ ПРОИЗВОДА.....	39
4.6. ЛАБОРАТОРИЈСКИ АНАЛИТИЧКИ ПОСТУПЦИ.....	39
4.6.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕФЛУЕНАТА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ.....	39
4.6.2. АНАЛИЗА КУЛТИВАЦИОНЕ ТЕЧНОСТИ.....	40
4.7. СТАТИСТИЧКА И МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА.....	41
4.8. КИНЕТИЧКО МОДЕЛОВАЊЕ И ПРОРАЧУН КИНЕТИЧКИХ ПАРАМЕТАРА БИОПРОЦЕСА.....	42
4.8.1. КИНЕТИЧКИ МОДЕЛ ЗА НАСТАЈАЊЕ БИОМАСЕ.....	44
4.8.2. КИНЕТИЧКИ МОДЕЛ ЗА БИОСИНТЕЗУ ПРОИЗВОДА.....	45
4.8.3. КИНЕТИЧКИ МОДЕЛ ЗА ПОТРОШЊУ ИЗВОРА УГЉЕНИКА.....	45
4.9. ГЕНЕРИСАЊЕ СИМУЛАЦИОНОГ МОДЕЛА БИОПРОЦЕСА.....	46
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	47
5.1. СКРИНИНГ МОГУЋНОСТИ ПРИМЕНЕ ЕФЛУЕНАТА У БИОТЕХНОЛОШКОЈ ПРОИЗВОДЊИ КСАНТАНА.....	48
5.2. ИСПИТИВАЊЕ БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА ЕФЛУЕНТИМА ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА.....	52
5.2.1. АНАЛИЗА ЕФЛУЕНАТА ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА.....	52
5.2.2. ИСПИТИВАЊЕ МОГУЋНОСТИ И ПРОЦЕНА УСПЕШНОСТИ БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНОМ МЕДИЈУМУ СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА.....	54
5.2.3. ОПТИМИЗАЦИЈА САСТАВА КУЛТИВАЦИОНОГ МЕДИЈУМА.....	57
5.2.4. КИНЕТИКА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНОМ МЕДИЈУМУ СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА И НА ПОЛУСИНТЕТИЧКОЈ ПОДЛОЗИ СА ГЛУКОЗОМ.....	65
5.2.5. СИМУЛАЦИЈА ПРОЦЕСА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНОМ МЕДИЈУМУ СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА.....	73

5.3. БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА НА ЕФЛУЕНТИМА РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ	78
5.3.1. АНАЛИЗА ЕФЛУЕНАТА ИЗ РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ	78
5.3.2. БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНИМ МЕДИЈУМИМА СА ЕФЛУЕНТИМА РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ.....	82
5.3.2.1. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера.....	82
5.3.2.2. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из кондиторске индустрије	83
5.3.2.3. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из прераде воћа и поврћа	85
5.3.2.4. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из меснопрерађивачке индустрије	87
5.3.2.5. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње и прераде млека	89
5.3.2.6. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из млинарске индустрије	91
5.3.2.7. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње безалкохолних пића	92
5.3.2.8. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохолних пића	94
5.3.2.9. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола.....	96
5.3.2.10. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње колагених омотача	99
5.3.2.11. Процена успешности биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехрамбене индустрије.....	100
5.3.3. ОПТИМИЗАЦИЈА САСТАВА ПОЛУСИНТЕТИЧКЕ ПОДЛОГЕ СА ГЛУКОЗОМ ЗА ПРОИЗВОДЊУ КСАНТАНА.....	103
5.3.4. КИНЕТИКА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНИМ МЕДИЈУМИМА СА ЕФЛУЕНТИМА РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ	109
5.3.4.1. Кинетике биосинтезе ксантана у увећаним размерама на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом.....	109
5.3.4.2. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса	113
5.3.4.3. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи....	117
5.3.4.4. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива.....	120
5.3.4.5. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина.....	124
5.3.4.6. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера	127
5.3.4.7. Поређење кинетичких параметара биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационим медијумима са ефлуентима различитих грана прехрамбене индустрије.....	131
5.3.5. СИМУЛАЦИЈА ПРОЦЕСА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНИМ МЕДИЈУМИМА СА ЕФЛУЕНТИМА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ	133
6. ЗАКЉУЧАК.....	143
7. ЛИТЕРАТУРА	147

СПИСАК ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

b_1, b_2, b_3	линеарни коефицијенти регресионе једначине
b_{11}, b_{22}, b_{33}	квадратни коефицијенти регресионе једначине
b_{12}, b_{13}, b_{23}	коефицијенти инретакције регресионе једначине
DF	степен слободе
K	фактор конзистенције, [Pa·s ⁿ]
K_C	конверзија извора угљеника, [%]
K_K	конверзија извора угљеника у ксантан, [%]
K_N	конверзија азота, [%]
K_P	конверзија фосфора, [%]
MS	средња вредност квадрата
n	индекс тока, [1]
N_{as}	садржај асимилабилног азота, [g/l]
N_{uk}	садржај укупног азота, [g/l]
P	садржај производа ксантана, [g/l],
pH	мера активности водоникових јона у раствору, [1]
P_{uk}	садржај фосфора, [g/l]
rN_{uk}	садржај резидуалног азота, [g/l]
r_p	брзине производње ксантана, [g/l·h]
rP_{uk}	садржај резидуалног фосфора [g/l]
r_s	брзине потрошње извора угљеника, [g/l·h]
rS	садржај резидуалног извора угљеника, [g/l]
r_x	брзине производње биомасе, [g/l·h]
S	садржај извора угљеника, [g/l]
SS	сума квадрата
t	време биосинтезе, [h]
X	садржај биомасе, [g/l]
X_m	максималан садржај биомасе, [g/l]
X_1, X_2, X_3	испитиване независне променљиве укључени у моделовање
Y_i	моделовани одзиви
$Y_{P/S}$	коефицијент приноса ксантана, [%]
$Y_{X/S}$	коефицијент приноса биомасе, [g/g]
α	параметар који зависи од раста у <i>Luedeking-Piret</i> -овом моделу, [gP/gX]
β	параметар који не зависи од раста у <i>Luedeking-Piret</i> -овом моделу, [gP/gX·h]
γ	параметар који зависи од раста у модификованом <i>Luedeking-Piret</i> -овом моделу, [gS/gX]
δ	параметар који не зависи од раста у модификованом <i>Luedeking-Piret</i> -овом моделу, [gS/gX·h].
η_a	привидни вискозитет ферментационог медијума, [mPa·s]
μ	специфична брзина раста, [h ⁻¹]
μ_m	максимална специфична брзина раста, [h ⁻¹]
БПК ₅	биохемијска потрошња кисеоника, [mg/l]
ТСС	садржај укупних суспендованих честица, [mg/l]
ТС	садржај укупне чврсте материје, [mg/l]
ТЧ	садржај таложивих честица, [mg/l]
ХПК	хемијска потрошња кисеоника, [mg/l]

СПИСАК СЛИКА

Слика 3.1. Мапа привредних субјеката регистрованих у оквиру прехранбене индустрије Војводине.....	15
Слика 3.2. Кораци у пројектовању биотехнолошког процеса - од идеје о производу до производног постројења.....	26
Слика 3.3. Кораци при дефинисању модела у софтверу за симулацију биопроцеса.....	32
Слика 5.1. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	54
Слика 5.2. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	55
Слика 5.3. Поређење експерименталних вредности одзива након биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља и вредности предвиђених моделима.....	60
Слика 5.4. Садржај ксантана у култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља, као функција две променљиве при константној вредности треће.....	61
Слика 5.5. Суперпонирани дијаграми одабраних одзива након биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	64
Слика 5.6. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	65
Слика 5.7. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	66
Слика 5.8. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	67
Слика 5.9. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	68
Слика 5.10. Ток биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	70
Слика 5.11. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	71
Слика 5.12. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	71
Слика 5.13. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	72
Слика 5.14. Дијаграм тока производње ксантана.....	75
Слика 5.15. Симулација тока биосинтезе ксантана на (а) култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља и (б) полусинтетичкој подлози са глукозом.....	76

Слика 5.16. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера.....	83
Слика 5.17. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса.....	84
Слика 5.18. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње чоколаде.....	85
Слика 5.19. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње замрзнутог воћа.....	86
Слика 5.20. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње замрзнутог поврћа.....	87
Слика 5.21. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из меснопрерађивачке индустрије.....	88
Слика 5.22. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње и прераде млека.....	89
Слика 5.23. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње киселомлечних производа.....	90
Слика 5.24. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње скроба.....	91
Слика 5.25. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње сока од јабуке.....	92
Слика 5.26. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње сока од брескве.....	93
Слика 5.27. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива.....	95
Слика 5.28. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина.....	95
Слика 5.29. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи.....	97
Слика 5.30. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола из кукуруза.....	97
Слика 5.31. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола из скробних сировина.....	98
Слика 5.32. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње колагених омотача.....	99
Слика 5.33. Поређење експерименталних вредности одзива након биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом и вредности предвиђених моделима.....	105
Слика 5.34. Садржај ксантана у полусинтетичкој подлози са глукозом, као функција две променљиве при константној вредности треће.....	107
Слика 5.35. Ток биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом.....	109

Слика 5.36. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом.....	110
Слика 5.37. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом.....	111
Слика 5.38. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом.....	112
Слика 5.39. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса	113
Слика 5.40. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса.....	114
Слика 5.41. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса	115
Слика 5.42. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса.....	115
Слика 5.43. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи	117
Слика 5.44. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи.....	118
Слика 5.45. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи..	118
Слика 5.46. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи.....	119
Слика 5.47. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива.....	121
Слика 5.48. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива	122
Слика 5.49. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива.....	122
Слика 5.50. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива	123
Слика 5.51. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина.....	124

Слика 5.52. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина	125
Слика 5.53. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина.....	126
Слика 5.54. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина	126
Слика 5.55. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера.....	128
Слика 5.56. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера..	129
Слика 5.57. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера.....	129
Слика 5.58. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера	130
Слика 5.59. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент припреме инокулума.....	134
Слика 5.60. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент биосинтезе.....	135
Слика 5.61. Симулација тока биосинтезе ксантана на (а) оптимизованој подлози са глукозом (а), односно на култивационом медијуму са отпадном водом из производње (б) кекса, (в) алкохола на меласи, (г) пива, (д) вина и (ђ) шећера.....	136
Слика 5.62. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент биосепарације.....	137
Слика 5.63. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент управљање споредним производима.....	139

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 3.1. Процењене количине отпадних вода које генерише прехранбена индустрија.....	8
Табела 3.2: Литературни подаци о општим карактеристикама отпадних вода преграмбене индустрије и индустрије пића	10
Табела 3.3. Различите примене ксантана.....	24
Табела 5.1. Реологија култивационих медијума након биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије	49
Табела 5.2. Показатељи успешности скрининга биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије.....	50
Табела 5.3. Карактеристике отпадне воде из производње јестивог уља	53
Табела 5.4. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње уља и полусинтетичке подлоге са глукозом током биосинтезе ксантана.....	55
Табела 5.5. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља и на полусинтетичкој подлози са глукозом	56
Табела 5.6. Вредности независних променљивих и одзива након биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	57
Табела 5.7. Реолошки параметри култивационих течности након биосинтезе ксантана на медијуму са отпадном водом из производње уља.....	58
Табела 5.8. Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за биосинтезу ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља	59
Табела 5.9. Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за биосинтезу ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља	60
Табела 5.10. Одабрани резултати оптимизације састава култивационог медијума са отпадном водом из производње уља: процењене вредности.....	63
Табела 5.11. Резултати валидације развијених модела при оптимизованом саставу култивационог медијума са отпадном водом из производње уља.....	64
Табела 5.12. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	69
Табела 5.13. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	72
Табела 5.14. Симулирани састав медијума пре и након биореакције добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља.....	74
Табела 5.15. Економски показатељи модела биопроеца производње ксантана применом култивационог медијума са отпадном водом из производње уља или полусинтетичке подлоге са глукозом.....	77
Табела 5.16. Карактеристике отпадних вода различитих грана прехранбене индустрије са територије АП Војводине	79
Табела 5.17. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње шећера током биосинтезе ксантана	83

Табела 5.18. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње кекса током биосинтезе ксантана.....	84
Табела 5.19. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње чоколаде током биосинтезе ксантана	85
Табела 5.20. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње замрзнутог воћа током биосинтезе ксантана.....	86
Табела 5.21. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње замрзнутог поврћа током биосинтезе ксантана	87
Табела 5.22. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из меснопрерађивачке индустрије током биосинтезе ксантана.....	88
Табела 5.23. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње и прераде млека током биосинтезе ксантана	89
Табела 5.24. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње киселомлечних производа током биосинтезе ксантана	90
Табела 5.25. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње скроба током биосинтезе ксантана.....	91
Табела 5.26. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње сока од јабуке током биосинтезе ксантана.....	92
Табела 5.27. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње сока од брескве током биосинтезе ксантана.....	93
Табела 5.28. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње пива током биосинтезе ксантана	95
Табела 5.29. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње вина током биосинтезе ксантана	95
Табела 5.30. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње алкохола на меласи током биосинтезе ксантана.....	97
Табела 5.31. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње алкохола из кукуруза током биосинтезе ксантана	97
Табела 5.32. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње алкохола из скробних сировина током биосинтезе ксантана.....	98
Табела 5.33. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње колагених омотача током биосинтезе ксантана.....	99
Табела 5.34. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехрамбене индустрије.....	100
Табела 5.35. Вредности независних променљивих и одзива након биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	103
Табела 5.36. Реолошки параметри култивационих течности након биосинтезе ксантана на подлози са глукозом	104
Табела 5.37. Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за биосинтезу ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	106
Табела 5.38. Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за биосинтезу ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.....	106

Табела 5.39. Резултати валидације развијених модела при оптимизованом саставу полусинтетичке подлоге са глукозом.....	108
Табела 5.40. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом.....	112
Табела 5.41. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса.....	116
Табела 5.42. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи.....	119
Табела 5.43. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива	123
Табела 5.44. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина	127
Табела 5.45. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера	130
Табела 5.46. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије и на оптимизованој подлози са глукозом.....	132
Табела 5.47. Симулирани састав медијума пре и након биореакције на подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије.....	137
Табела 5.48. Симулирани састав токова из сегмента биосепарације добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије	138
Табела 5.49. Симулирани састав ефлуената из сегмента управљања споредним производима добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије.....	140
Табела 5.50. Економски показатељи модела биопроцеса производње ксантана применом култивационог медијума са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије или оптимизоване полусинтетичке подлоге са глукозом	141

1. УВОД

У оквиру прехранбене индустрије вода се троши за транспорт сировина, излуживање жељених састојака, термичку обраду готових производа, расхлађивање, прање и чишћење опреме и просторија. Без обзира на њену намену у оквиру конкретне технологије највећи део употребљене воде доспева у отпадне токове чији састав и количине варирају у широким границама, на сезонском, а често и дневном нивоу. Капацитети прехранбене индустрије у нашој земљи, у обиму у коме су данас ангажовани, генеришу велике количине отпадних вода високог садржаја органских и неорганских материја. С обзиром да се оне најчешће испуштају у водотокове, непречишћене или недовољно пречишћене, имају изузетно негативан утицај на животну средину. Разлози оваквог управљања потрошњом воде леже у технологијама које су фокусиране само на производњу жељеног производа, а законска регулатива, односно њена неадекватна примена, у недовољној мери санкционише недوماћинско управљање енергетским ресурсима и ефлуентима. Ово, као приоритет, намеће имплементацију технологија са максималним искоришћењем сировина и енергије, минималним генерисањем отпадних ефлуената и/или њиховим рециклирањем, односно секундарном употребом. С обзиром на процесне услове под којима се одвија и природу сировина које обрађује прехранбена индустрија, њене отпадне воде могу бити супстрати за биотехнолошку производњу различитих производа који имају тржишну вредност, међу којима се налази и биополимер ксантан.

Ксантан је екстрацелуларни полисахарид микробиолошког порекла који се производи субмерзном, аеробном култивацијом применом чисте културе *Xanthomonas campestris* на хранљивој подлози одговарајућег састава. Карактеристика биосинтезе ксантана је неспецифичност угљенохидратног супстрата, због чега се као основа подлоге за његову производњу могу применити различити ефлуенти. Поред састава подлоге, успешност производње ксантана зависи од генетског потенцијала производног микроорганизма и његовог одржавања, услова под којима се процес одвија, технике и опреме за производњу, као и од поступка издвајања и пречишћавања производа. Захваљујући специфичним карактеристикама, ксантан има широку примену у многим гранама индустрије. Несумњиво велики значај свих напора за побољшање ефикасности процеса производње ксантана, бројним вредностима исказан је у извештају компаније *Grand View Research Inc.* у коме се наводи да ће у наредној деценији доћи до значајног пораста светског тржишта ксантана, које ће до 2020. године достићи вредност од 987,7 милиона америчких долара.

С обзиром да биотехнолошки процес производње ксантана применом ефлуената прехранбене индустрије представља једно од могућих решења проблема загађења животне средине, при чему се на ефикасан и економичан начин добија производ са тржишном вредношћу, јавила се потреба за формулисањем оптималног састава култивационих медијума чија су основа отпадни токови, одређивањем процесних услова који омогућавају жељену метаболичку активност конкретног производног микроорганизма и дефинисање кинетике овог биопроцеса, што за циљ има генерисање модела биопроцеса производње ксантана.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ ове докторске дисертације је генерисање симулационог модела производње ксантана на ефлуентима прехранбене индустрије којим се у првом реду предвиђају процесни, али и економски показатељи анализираниог биотехнолошког поступка, превасходно у сегменту самог биопроцеса, односно у делу постројења у коме се дешава биореакција. Остварење овако постављеног циља захтева познавање процеса биосинтезе ксантана и природе биокатализатора, специфичних захтева у смислу карактеристика сировина које се могу применити и поступака њихове припреме, технологије производње екстрацелуларних полисахарида укључујући и пожељне биосепарационе технике, као и познавање импакта предложеног биотехнолошког поступка на животну средину.

Реализација основног циља ове докторске дисертације захтева испуњење следећих специфичних циљева:

- скрининг могућности биосинтезе ксантана референтним сојем *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на ефлуентима различитих грана прехранбене индустрије,
- карактеризација ефлуената различитих грана прехранбене индустрије,
- испитивање тока биосинтезе ксантана на култивационим медијумима чија су основа ефлуенти различитих грана прехранбене индустрије,
- оптимизација почетне концентрације нутријената у култивационом медијуму за биосинтезу ксантана применом методе жељене функције,
- утврђивање кинетике раста производног микроорганизама, кинетике потрошње супстрата и кинетике добијања ксантана биосинтезом на оптимизованим подлогама чија су основа ефлуенти различитих грана прехранбене индустрије,
- генерисање модела и анализа биопроцеса производње ксантана на ефлуентима различитих грана прехранбене индустрије применом симулационог софтвера.

Очекивани резултати ових истраживања, добијени математичким и кинетичким моделовањем као и симулацијом биопроцеса на основу реалних експерименталних података применом одговарајућих софтвера, су са технолошког аспекта поуздан извор информација и као такви представљају основу за дефинисање идејног решења предложеног биотехнолошког поступка, на основу ког је могућа израда главног технолошког пројекта. Очекује се да резултати недвосмислено укажу на одрживост и економску оправданост производње биополимера ксантана применом отпадних ефлуената различитих грана прехранбене индустрије.

3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

3.1. ЕФЛУЕНТИ ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ КАО СИРОВИНЕ У БИОТЕХНОЛОШКОЈ ПРОИЗВОДЊИ

Утврђивање могућности поновне употребе течних ефлуената различитих грана индустрије је од великог значаја када се узме у обзир ограниченост природних водних ресурса. Индустријске отпадне воде представљају потенцијалну сировину за биотехнолошку производњу којом би оне биле осиромашене у погледу органских и неорганских извора загађења уз настанак производа са додатом вредношћу. Све обимнија индустријализација која је одговор на захтеве потрошачког друштва, велики је експлоататор ресурса и генератор значајних количина отпадних ефлуената, поред жељеног производа. Узимајући у обзир количину отпадних токова које генерише прехрамбена индустрија, као и количину органских и неорганских састојака у њима, јасно је да су оне велико оптерећење за животну средину, али и потенцијално вредна сировина уколико су доступни економски исплативи поступци њихове прераде (Anderson, 2003; Додић и сар., 2014; Вајић et al., 2015a).

Емисија великих количина ефлуената у природне реципијенте проблем је данашњице, а уз евидентан тренд повећања оптерећења у квалитативном и квантитативном смислу, неизоставно ће бити проблем и у будућности. Иако се за уочене проблеме нуде многа решења, само је свеобухватан и сврсисходан приступ са јасном економском добити решење проблема које је одрживо. Биотехнолошка производња, која подразумева употребу биокатализатора за конвертовање сировине у производ са тржишном вредношћу, отвара могућност за одрживи развој у овој области (Додић и сар., 2014).

3.1.1. ОТПАДНЕ ВОДЕ ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

Највећи загађивач водних ресурса данашњице представља индустрија, коју одликује велика количина отпадних вода и веома разноврсне загађујуће материје. Индустријске отпадне воде потичу из производних процеса и обухватају процесне, расхладне, санитарне и отпадне воде од чишћења опреме и постројења. Како су у питању ефлуенти различитих грана примарне и прерађивачке индустрије њихова количина и својства зависе од природе индустрије која их генерише, употребљених сировина, производног процеса и управљања материјалним и енергетским токовима. Треба напоменути да се значајне разлике у карактеристикама не уочавају само међу отпадним водама различитих индустријских грана, већ и да у оквиру исте гране индустрије постоје разлике. Оне се јављају као последица примењене технологије производње, снабдевања водом и водом за прераду, техничког стања и старости производних постројења, обуке и мотивације запослених, употребе одређених адитива и средстава за чишћење, режима рада, броја смена, сезонског карактера, захтева за отпадну воду (директно или индиректно испуштање), примењених сировина и помоћних средстава, система за пречишћавање отпадних вода, итд (Rosenwinkel et al., 2005; Далмација и сар., 2014).

Количина индустријских отпадних вода може варирати у широком опсегу, како током дана, тако и у дужем временском периоду, што је последица динамике настајања отпадних вода унутар производног поступка, али и различитог интензитета рада индустрије. Посебно се истичу ударна испуштања отпадних вода, односно испуштања веће количине отпадне воде у релативно кратком времену, до чега може доћи при уобичајеном режиму рада индустрије, али и услед планираних или непланираних застоја у раду. Варијације протока отпадних вода у дужем времену јављају се код индустрије са сезонским и кампањским карактером рада, тј. ако индустрија ради са променљивим капацитетом или програмом производње током године (Далмација и сар., 2014). У поређењу са другим секторима прерађивачке индустрије, прехрамбена индустрија и индустрија пића користе много већу количину воде по јединици производа па последично генеришу и већу количину отпадних вода (Cristian, 2010).

По пореклу, отпадна вода фабрике је заправо збир више отпадних вода које настају унутар те фабрике. Отпадне воде фабрике састоје се од отпадних вода из процеса производње, односно технолошких отпадних вода, санитарних отпадних вода и оборинских вода (киша, топљење снега, итд.). Технолошке отпадне воде могу се поделити и на отпадне воде из самог процеса, отпадне воде од прања, хлађења и из енергане. Варијације у количини и у степену загађености технолошких отпадних вода су значајне када је у питању шаржна производња. Санитарна отпадна вода потиче из мокрих чворова у фабрици и из кухиње ресторана унутар фабрике, док оборинска, односно атмосферска, вода доспева са кровова фабричких зграда и са фабричког круга (Клашња и Шћибан, 2000).

Након утврђивања порекла, следећи корак у карактеризацији отпадних вода фабрике је добијање података о њиховој количини. До количине отпадне воде које генерише фабрика се долази на два начина, проценом или мерењем протока отпадне воде. Процена количине отпадне воде из конкретног производног поступка врши се на основу капацитета фабрике, количине утрошене воде, норматива, примењених оперативних процедура и др. Поуздани подаци о количини и карактеристикама отпадних вода које генерише фабрика, као и о динамици њиховог испуштања добијају се непосредним мерењем протока и анализом репрезентативних узорака. Међутим, у пракси се показало да је одређивање количине отпадних вода велики проблем, односно мали је број фабрика у којима постоје прихватљиво прецизни подаци о количини генерисаних отпадних вода, или они нису доступни, иако постоји обавеза постављања уређаја за мерење и регистрацију количине насталих отпадних вода (Клашња и Шћибан, 2000).

У последњих неколико година у Републици Србији је на снази Закон о заштити животне средине („Сл. гласник РС“ бр. 135/04 и 36/09) и у складу са њим обавеза пријављивања количине и састава отпадних токова Агенцији за заштиту животне средине у ресорном министарству. Овом пропису, којим су дефинисани методологија, начин прикупљања података и рокови њиховог достављања, подлежу сва правна лица и предузетници чија активност доводи до загађења животне средине у смислу емисија загађујућих материја у ваздух, воде и тло као и генерисања отпада, а чији су капацитети већи од прописаних. На основу прикупљених података формирани су Локални и Национални регистар извора загађивања у чијем се саставу налазе и индустријске отпадне воде.

Литературни подаци о количини отпадне воде коју генеришу производна постројења различитих грана прехрамбене индустрије и индустрије пића изражени по јединици сировине или производа приказани су у табели 3.1. и најчешће су у питању процењене вредности.

Табела 3.1. Процењене количине отпадних вода које генерише прехранбена индустрија

Грана индустрије	Сировина/Производ	Количина отпадне воде по јединици сировине/производа [m ³ /t]	Референца
производња шећера			
	шећерна репа	0,8	Rosenwinkel et al., 2005
производња јестивог уља			
	семе уљарица	10,0	Rosenwinkel et al., 2005
	рафинисано уље	6,8	Грујић и Франц, 2013
	маслиново уље	57,5	Грујић и Франц, 2013
производња и прерада млека			
	млеко	1,0-2,0	Rosenwinkel et al., 2005
	маслац	2,6	Грујић и Франц, 2013
	сир	7,7	Грујић и Франц, 2013
	сладолед	3,0	Грујић и Франц, 2013
производња брашна и хлеба			
	брашно	0,0	Грујић и Франц, 2013
	хлеб	0,11	Грујић и Франц, 2013
	скроб	33,0	Грујић и Франц, 2013
производња скроба			
	кукуруз	1,5-3,0	Rosenwinkel et al., 2005
	пшеница	1,5-2,5	Rosenwinkel et al., 2005
	кромпир	1,5-2,3	Rosenwinkel et al., 2005
прерада воћа и поврћа			
конзервирано	карфиол	90,0	Грујић и Франц, 2013
	маслина	38,1	Грујић и Франц, 2013
	шљива	5,0	Грујић и Франц, 2013
	јагода	13,0	Грујић и Франц, 2013
	шпаргла	68,8	Грујић и Франц, 2013
	кукуруз	4,5	Грујић и Франц, 2013
	лук	23,0	Грујић и Франц, 2013
	спанаћ	37,6	Грујић и Франц, 2013
	шаргарепа	12,1	Грујић и Франц, 2013
	замрзнуто	кукуруз	13,3
производи од кромпира		11,3	Грујић и Франц, 2013
спанаћ		29,2	Грујић и Франц, 2013
поврће		22,1	Грујић и Франц, 2013
сушено	лук	19,9	Грујић и Франц, 2013
	гљиве	22,4	Грујић и Франц, 2013
	производи од кромпира	8,8	Грујић и Франц, 2013
индустрија врења			
квашчара	квасац	150,0	Грујић и Франц, 2013
пивара	пиво	2,5-6,0	Rosenwinkel et al., 2005
винарија	вино	5,0-8,0	Mosse et al., 2010
дестилерија (скроб)	етанол	113,0	Грујић и Франц, 2013
дестилерија (меласа)	етанол	63,0	Грујић и Франц, 2013
дестилерија (вино)	етанол	36,0	Грујић и Франц, 2013

Табела 3.1. (наставак) Процењене количине отпадних вода које генерише прехранбена индустрија

Грана индустрије	Сировина/Производ	Количина отпадне воде по јединици сировине/производа [m ³ /t]	Референца
производња и прерада меса			
кланице	жива вага	5,3	Грујић и Франц, 2013
прерада	жива вага	12,3	Грујић и Франц, 2013
екстракција масти	сирови материјал	10,0	Rosenwinkel et al., 2005
производња готових јела			
	готова јела	12,0	Грујић и Франц, 2013
	сосови од поврћа	8,5	Грујић и Франц, 2013
	специјалитети од меса	10,0	Грујић и Франц, 2013
производња безалкохолних пића и сокова			
	грејпфрут	73,0	Грујић и Франц, 2013
	вишња	20,0	Грујић и Франц, 2013
	безалкохолно пиће	12,8	Грујић и Франц, 2013

Разлике у процењеним количинама отпадних вода у оквиру исте гране индустрије могу да буду последица различитих примењених производних поступака и/или мера које се предузимају за смањење количине отпадних вода у конкретним производним поступцима а које су све чешће примењиване у новије време. Поред тога, цена коштања чисте воде као и накнаде које су прописане за количине и оптерећење отпадних вода које се емитују у животну средину, у великој мери се разликују у различитим државама и регионима. Није редак случај, а код нас је готово уобичајено, да се домаћински управља потрошњом воде у производним процесима, једним делом због експлоатације застарелих технологија које нису иновирани у дугом периоду, али и због одсуства доследне примене легислативе која уређује ову област.

3.1.2. КАРАКТЕРИСТИКЕ ОТПАДНИХ ВОДА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

Карактеристике отпадних вода прехранбене индустрије и индустрије пића зависе од врсте производа који се производи. Две фабрике, чак и са сличним капацитетима, неће генерисати отпадне воде истих својстава и количине, јер постоји много променљивих параметара који одређују крајње карактеристике отпадне воде (Liu, 2007). У производњи, по правилу, настаје више различитих отпадних вода које се могу значајно разликовати у зависности од природе дела поступка производње у којима настају. Већина технолошких поступака у прехранбеној индустрији и индустрији пића је још увек шаржна, што има за последицу велике варијације у количини и у степену оптерећења технолошких (процесних) отпадних вода (Клашња и Шћибан, 2000).

Неки од најважнијих показатеља квалитета воде су: потрошња кисеоника, садржај органских материја, садржај чврстих честица, садржај хранљивих материја, итд. Ови и други подаци о општим карактеристикама отпадних вода различитих грана прехранбене индустрије и индустрије пића приказани су у табели 3.2.

Табела 3.2: Литературни подаци о општим карактеристикама отпадних вода прехранбене индустрије и индустрије пића

Грана прехранбене индустрије из које потиче отпадна вода	рН [1]	ХПК [mg/l]	БПК ₅ [mg/l]	N _у к [mg/l]	P _у к [mg/l]	Остале карактеристике	Чврсте материје	Референца
рафинација јестивог уља и масти	5-9	<600	-	-	-	липофилне супстанце: <150 [mg/l]	TЧ: <1 [ml/l]	Rosenwinkel et al., 2005
производња маргарина	5-9	1000-2000	-	-	-	липофилне супстанце: <250 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
рафинација јестивог уља	6,3-7,2	13,750-15,000	4300-4700	636-738	61-63	Уља и масти: 3600-3900 [mg/l]	TCC: 3800-4130 [mg/l]	Azbar and Yonar, 2004
рафинација јестивог уља	1,9	29120	-	-	57,4 као (PO ₄ ³⁻)	Уља и масти: 7782 [mg/l] сулфиди: 8,4 [mg/l] сулфати: 2,0 [mg/l]	-	Pandey et al., 2003
производња шећера (кондензат)	8,5-9,5	200-400	-	-	-	калцијум: 100-300 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња шећера (вода од транспорта, прања и оборинска)	6-11	6000-14000	-	20-40	-	калцијум: 80-25000 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња шећера	6,82	6621	-	10	2,7	калцијум: 378 [mg/l]	TC: 6062 [mg/l] TCC: 665 [mg/l]	Alkaya and Demirer, 2011
кондиторска индустрија	5,64	9720	486,7	92,5	-	натријум: 130 [mg/l] калијум: 110 [mg/l]	TC: 763,5 [mg/l] TCC: 224 [mg/l]	Qasim and Mane, 2013
производња сладоледа	6,25	11900	523,5	88,51	-	натријум: 156,8 [mg/l]	TC: 664 [mg/l] TCC: 264 [mg/l]	Qasim and Mane, 2013
кондиторска индустрија (производња чоколаде)	11,62	425	345	-	-	хлориди: 9,99 [mg/l]	TCC: 0,964 [mg/l]	Ammar, 2014
прада воћа и поврћа	6-8	-	400-500	10-20	0,1-0,5	-	TCC: 1200-3000 [mg/l]	Гагеша, 1980
прада мяса (свиње)	-	2000-8000	1000-4000	150-500	15-50	масти: 500-2500 [mg/l]	TЧ: 10-60 [ml/l]	Rosenwinkel et al., 2005
прада мяса (живина)	-	2200-4000	1000-2500	150-300	5-30	масти: 300-1200 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
прада мяса	8,02	1683	863	2743,6	328,4	TCC: 640,2 [ml/l]	-	Cristian, 2010

Табела 3.2 (наставак): Литературни подаци о општим карактеристикама отпадних вода прехранбене индустрије и индустрије пића

Грана прехранбене индустрије из које потиче отпадна вода	pH [1]	ХПК [mg/l]	БПК ₅ [mg/l]	N _{тук} [mg/l]	P _{тук} [mg/l]	Остале карактеристике	Чврсте материје	Референца
производња млека	6-11	500-4500	500-2000	30-250	10-100	липофилне супстанце: 20-250 [mg/l]	ТЧ: 1-2 [ml/l]	Rosenwinkel et al., 2005
производња млека	3,6-10,4	600-8500	300-4800	20-200	5-75	масти: 50-2600 [mg/l]	-	Клашња и Шћибан, 2000
производња сира/сурутке	6,2-11,3	785-7619	565-5722	14-140	29-181	калцијум: 1,4-58,5 [mg/l] магнезијум: 6,5-46,3 [mg/l] калијум: 8,6-155,5 [mg/l] натријум: 263-1265 [mg/l]	ТС: 1837-14250 [mg/l] TCC: 326-3560 [mg/l]	Wang L et al., 2006
производња кукурузног скрба	-	2500-3500	1700-2500	100	60	сумпор: 110 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња пшеничног скрба	3,5-4,6	18750-48280	11600-24900	610-1440	115-240	сумпор: 120-410 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња безалкохолних пића	-	1200-8000	600-4500	150-300 (као NH ₄ ⁺)	20-40 (као PO ₄ ³⁻)	сумпор (као SO ₄ ²⁻): 7-20 [mg/l] натријум: 1500-2500 [mg/l] калијум: 20-70 [mg/l]	TCC: 0-60 [mg/l]	Wang L et al., 2006
производња и флаширање воћног сока	-	400-3000	400-2000	9-25	2-14	-	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња пива	-	1800-3000	1100-1500	30-100	10-30	-	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња белих вина	6,0	3112	1740	67	7	масти и уља: 27 [mg/l] феноли: 280 [mg/l]	ТС: 3900 [mg/l] TCC: 140 [mg/l]	Vlyssides et al., 2005
производња црвених вина	6,2	3997	1970	71	8,5	масти и уља: 25 [mg/l] феноли: 1450 [mg/l]	ТС: 4100 [mg/l] TCC: 220 [mg/l]	Vlyssides et al., 2005
производња алкохола (збирна отпадна вода)	3-5	-	13000-35000	500-1700	100-400	калцијум: 90-140 [mg/l] натријум: 260-540 [mg/l] магнезијум: 70-100 [mg/l] калијум: 1300-2100 [mg/l]	-	Rosenwinkel et al., 2005
производња алкохола на меласи	5,35	91,10	44,90	3569	163	калцијум: 10030 [mg/l] сумпор: 3716 [mg/l]	-	Wilkie et al., 2000
производња алкохола из кукуруза	3,3-4,0	64500	26900-	1170	755	-	-	Wilkie et al., 2000
производња алкохола из пшенице	4,0-4,5	20000-30000	-	0,17-0,18	0,27-0,30	-	-	Laubscher et al., 2001

Отпадне воде прехранбене индустрије садрже растворене органске материје из различитих технолошких операција, као и отпатке који потичу од машинских поступака у обради хране. Прехранбена индустрија и индустрија пића користе велике количине воде за прање и хлађење које по правилу не носе хемијско нити биолошко оптерећење, али су њихова физичка својства, у првом реду температура, измењена (Liu, 2007).

Санитарна отпадна вода по свом саставу је веома слична отпадној води домаћинства, чија су својства, количина и загађење, углавном добро познате. Оборинска вода је по правилу слабо загађена вода, уколико се пази на чистоћу фабричког круга. Према томе, када се зна порекло отпадне воде постоји, познавајући технолошки поступак производње и пре било каквих мерења, груба представа о количини и степену загађености отпадних вода (Клашња и Шћибан, 2000).

Отпадне воде прехранбене индустрије и индустрије пића се могу окарактерисати као воде органског карактера, које су нетоксичне и у којима се могу наћи патогени микроорганизми. У њима су најчешће присутне растворљиве органске, као и суспендоване материје које су различитог порекла и зависе од врсте поступка у ком настаје отпадна вода, садрже веома мале количине токсичних материја, са изузетком средстава за чишћење, а могу да садрже и патогене микроорганизме пореклом из микробиолошки неисправних сировина или воде која се користи као технолошка или санитарна или са контаминираних радних површина и опреме (Alturkmani, 2013; Ammar, 2014).

3.1.3. КРИТЕРИЈУМИ ИЗБОРА ОТПАДНИХ ВОДА ЗА ИНДУСТРИЈСКЕ КУЛТИВАЦИОНЕ МЕДИЈУМЕ

Евидентно је да се већ у најближој будућности, развој биотехнолошке производње у индустријским размерама неће моћи одвојити од доступности и цена сировина. У том смислу, биотехнолошка производња све више ће се ослањати на биообновљиве органске материјале, али и на отпадне токове пољопривредне и индустријске производње мале економске вредности који се данас посматрају искључиво као загађивачи природне средине (Smith, 2004).

Посматрано искључиво из угла биотехнолошке производње, природне сировине које се могу употребити за припрему ферментационих медијума треба да (Барас, 2009):

- обезбеђују максималан принос биомасе или жељеног производа по јединици масе супстрата,
- обезбеђују максималну концентрацију биомасе или жељеног производа,
- обезбеђују максималну брзину настајања производа,
- обезбеђују минималан принос нежељеног производа,
- су доступне у дужем временском периоду и економски исплативе,
- не изазивају проблеме у односу на друге аспекте укупног биотехнолошког процеса (морфолошки облик организма, мешање и аерација, настајање пене, издвајање и пречишћавање производа и заштиту околине).

Како би се из читавог низа отпадних токова изабрали они који могу да остваре што више постављених захтева и као такви буду употребљени као сировина за биотехнолошку производњу у индустријским размерама, потребна су свеобухватна разматрања која обухватају (Smith, 2004):

- биолошку доступност састојака ефлуента који су доминантни нутријенти у изабраном процесу: ово подразумева да идентификовани састојци буду присутни у облику који је производном микроорганизму одговарајући;
- концентрацију састојка у ефлуенту и конзистенцију самог ефлуента: конзистенција ефлуента треба да олакша манипулацију (нпр. транспорт и складиштење), да минимизује могуће промене састава до његове непосредне употребе (нпр. микробиолошко кварење или раслојавање), а да при томе омогући да што већа количина у њему присутног жељеног састојка буде доступна производном микроорганизму;
- локацију на којој се генерише ефлуент: ако се потребне количине погодног ефлуента морају сакупљати са више локација пожељно је да оне буду тачкасте (велики капацитети генератора ефлуента на ограниченем простору) а не расуте;
- сезонска доступност: узимајући у обзир флукуације количина и састава ефлуената које су последица природе процеса који их генеришу, значајно би било да је ефлуент константно доступан или да се сезонски карактер може компензовати једноставним складиштењем, јефтином презервацијом или да се један ефлуент у својству сировине може заменити другим који је у датом тренутку доступан;
- алтернативна примена: пошто су састојци ефлуената који су доказано погодна сировина одговарајући за већину производних микроорганизма у комерцијализованим биотехнолошким процесима, велика потражња за њима на ограниченим тржиштима доводи до нежељених осцилација у доступности и цени коштања;
- локални технолошки потенцијал: неопходно је да постоји озбиљан потенцијал за генерисање потребних количина одговарајућег ефлуента у садашњости али и у будућности, како би индустријализована биотехнолошка производња која га као сировину користи била исплатива у дугом временском периоду.

Приликом избора природне сировине треба размотрити и потребу њене претходне припреме, потрошњу енергије и воде и додавања других сировина којима би се употпунио састав култивационог медијума. Управо из ових разлога треба тежити изналажењу природних сировина које у том смислу имају минимум захтева (Барас, 2009).

3.1.4. МОГУЋНОСТ ПРИМЕНЕ ОТПАДНИХ ВОДА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ ЗА ДОБИЈАЊЕ ТРЖИШНО ВРЕДНИХ БИОПРОИЗВОДА И БИОЕНЕРГЕНАТА

Ефлуенти и споредни производи различитих грана индустрије и пољопривреде могу се употребити за производњу тржишно вредних производа и енергије (Dodić et al., 2010a; Dodić et al., 2010b; Dodić et al., 2011; Граховац, 2011; Vučurović et al., 2012; Vajić et al., 2015b; Grahovac et al., 2016). Такође, отпадне воде прехранбене индустрије се могу посматрати као споредни производ прехранбених индустрија, који треба пажљиво анализирати како би се повећала његова вредност. Могућност примене отпадних вода у биотехнолошкој производњи огледа се у великом садржају органских материја, које представљају нутријенте за различите микроорганизме. Уз мале корекције садржаја, могуће је велико искоришћење ових вода (Liu, 2007).

У савременој литератури налази се значајан број истраживања која се баве применом отпадних вода различитих грана прехранбене индустрије у биотехнолошкој производњи различитих производа са тржишном вредношћу. У истраживањима која су извели Zhang и сарадници (2008) примењене су отпадне воде винарије за биотехнолошку производњу протеинске фунгалне биомасе, док су Prachanurak и сарадници (2014) испитивали производњу биомасе на отпадним водама индустрије скроба. D'Annibale и сарадници (2006) су испитали могућност валоризације отпадних вода индустрије производње маслиновог уља, као потенцијалног култивационог медијума за микробиолошку производњу екстрацелуларних липаза. Могућност производње пектиназа на отпадним водама из процеса производње моносоодијум глутамата, уз њихово обogaћење отпадном пулпом шећерне репе као извором угљеника испитали су Vai и сарадници (2004).

Отпадне воде различитих грана прехранбене индустрије се такође могу применити за производњу различитих биогорива. Yetis и сарадници (2000) су испитали могућност производње водоника, који представља алтернативу фосилним горивима, на отпадним водама шећеране. Isla и сарадници (2013) су проучавали могућност производње биоетанола на отпадним водама индустрије безалкохолних пића, док су могућност производње метана на отпадним водама индустрије маслиновог уља, винарије и кланице испитали Fountoulakis и сарадници (2008).

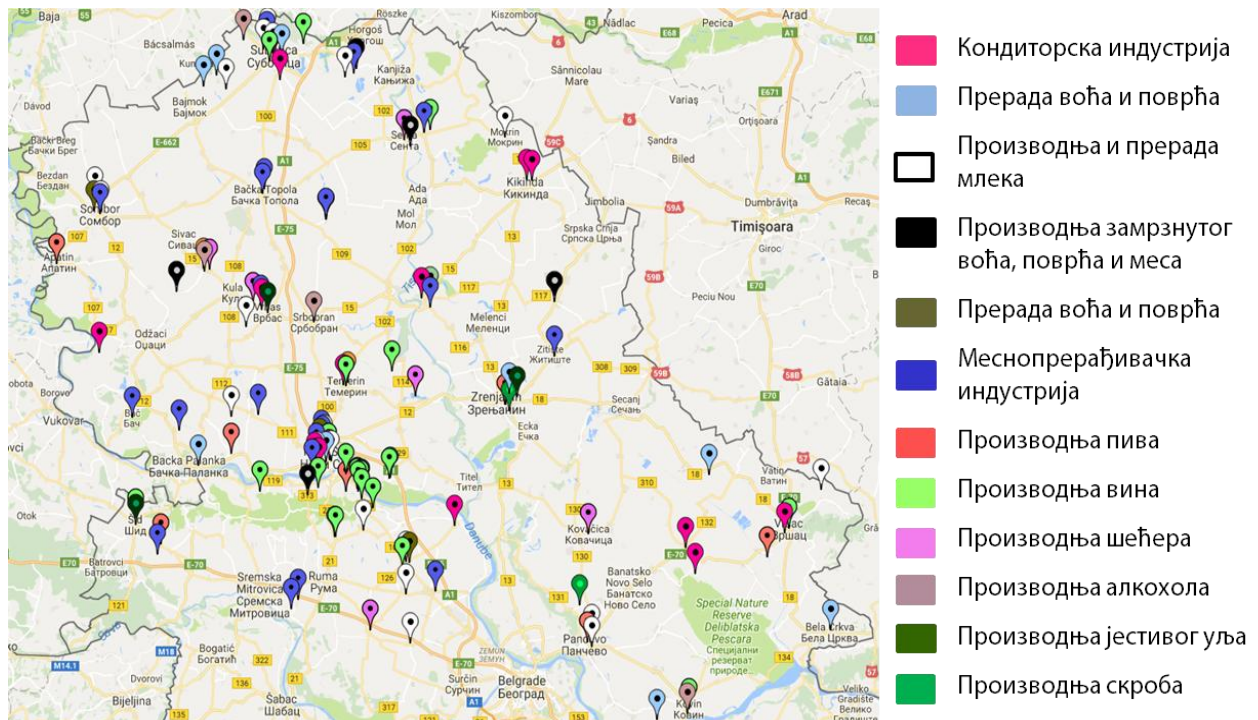
3.1.5. ОТПАДНЕ ВОДЕ ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ АП ВОЈВОДИНЕ

Основни извори загађивања вода у Војводини су насеља, индустрија и пољопривреда. На територији Војводине регистровано је 511 загађивача вода, од чега 326 загађивача потиче из индустрије, 113 загађивача из пољопривреде, 44 загађивача су насеља, док 20 припада осталим делатностима. Значајно загађење вода у Војводини потиче из прехранбене индустрије. Емисија из ове индустријске гране чини око 80% укупног индустријског загађења у Војводини. Реч је, углавном, о веома концентрисаним ефлуентима и зато је удео протицаја знатно мањи у односу на укупну продукцију (Далмација и сар., 2011).

У току 2013. године укупно је испуштено 102723 хиљада m^3 отпадних вода на територији Војводине, а од тога се 15591 хиљада m^3 пречишћавало (Еко-билтен 2013, 2014) . На основу података Републичког завода за статистику, количине отпадне воде из индустрије у 2013. години на територији Србије мање су за 13,9% у односу на 2012. годину, док је проценат пречишћених отпадних вода већи за 1,0%(Статистички годишњак Републике Србије, 2014) .

Војводина је високо развијени пољопривредни рејон у Србији са потенцијалима и производњом изнад домаћих потреба. Пољопривредна производња Војводине располаже са око 1586 хиљада хектара ораница и башта, више од 17 хиљада хектара воћњака, 12 хиљада хектара винограда и више од 34 хиљаде хектара ливада, што укупно чини 35% српских обрадивих површина. Велики пољопривредни потенцијал Војводине је основа на којој се развила прерађивачка индустрија, у првом реду прехранбена индустрија и индустрија пића. Најзначајније индустрије које се сврставају у овај сектор су шећеране, уљаре, млекаре, скробаре, фабрике за прераду воћа и поврћа, месна и индустрија кондиторских производа, као и индустрија врења која обухвата пиваре, винарије, дестилерије и фабрике алкохола (<http://www.pkv.rs>).

На слици 3.1. приказане су локације привредних субјеката или правних лица регистрованих у овом индустријском сектору на територији АП Војводине (Агенција за привредне регистре: АПР). Приказани подаци не указују на количине ефлуената које појединачно генеришу мапирани привредни субјекти, али се јасно уочавају подручја на којима су они концентрисани. При разматрању локалитета на којима су позиционирани мора се узети у обзир да су у АПР-у привредни субјекти регистровани на адреси управе, а да се код неких производња постројења не налазе на истим локацијама, да се производња не реализује у свим фабрикама у континуитету (привремена обустава производње, стечај...), као и да делатност није експлицитно исказана у називу самог привредног субјекта па је одређени број свакако занемарен.



Слика 3.1. Мапа привредних субјеката регистрованих у оквиру прехранбене индустрије АП Војводине

Прехранбена индустрија и индустрија пића представљају веома значајне загађиваче животне средине услед великих количина насталих отпадних токова богатих органским оптерећењем. Ове отпадне воде садрже загађења која су претежно органска и биодеграбилна и имају тенденцију преласка у кисело стање и брзо ферментисање. Ради спречавања погоршања квалитета воде и животне средине, прописане су граничне вредности емисије за одређене групе или категорије загађујућих супстанци (Закон о водама, „Сл. гласник РС“ бр. 30/10).

За сваку грану прехранбене индустрије и индустрије пића постоје прописане граничне вредности за поједине показатеље који карактеришу дату отпадну воду, а које се односе на емисију на месту испуштања у површинске воде (Уредба о граничним вредностима емисије загађујућих материја у воде и роковима за њихово достизање, „Сл. гласник РС“ бр. 67/11 и 48/12).

3.2. БИОТЕХНОЛОШКА ПРОИЗВОДЊА КСАНТАНА

Ксантан или ксантан гума је екстрацелуларни хетерополисахарид микробиолошког порекла велике молекулске масе. Откривен је средином 1950-их током системске потраге за корисним биополимерима. Значајнија комерцијална производња ксантана започета је 1964, а 1969. године Америчка здравствена агенција (FDA; енг: *Food and Drug Agency*) одобрила је његову примену у исхрани, док је у Европи одобрен 1982. године под Е бројем Е 415 (Born et al., 2005). Ксантан представља једини полисахарид микробиолошког порекла који се налази на листи 10 највише коришћених индустријских полисахарида. Прецизније, налази се на петом месту, иза кукурузног скроба, целулозе, гуар гуме и њихових деривата и арабика гуме, а испред алгината, пектина, карагенана, гуме рогача и гати (енг: *Ghatti*) гуме, док остали полисахариди микробиолошког порекла немају тако значајну комерцијалну вредност (Glazer and Nikaido, 2007).

У индустријским условима ксантан се производи дисконтинуално, субмерзном аеробном култивацијом, коришћењем чисте културе *Xanthomonas campestris* на хранљивој подлози одговарајућег састава и у оптималним условима. Успешност биосинтезе ксантана зависи од генетског потенцијала производног микроорганизама и његовог одржавања, врсте хранљиве подлоге, технолошког поступка, опреме за производњу, као и поступака издвајања готовог производа (Додић и Граховац, 2013).

3.2.1. ПРОИЗВОДНИ МИКРООРГАНИЗАМ

Производни микроорганизми су биолошки катализатори чија метаболичка активност има централну улогу у биотехнолошкој производњи (Додић и Граховац, 2013). У производњи ксантана као производни микроорганизам користи се *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Таксономски *Xanthomonas campestris* је бактерија из рода *Xanthomonas*, која припада породици *Xanthomonadaceae*, реду *Xanthomonadales*, класи *Gamma Proteobacteria*, разделу *Proteobacteria* у домену *Bacteria* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поред *X. campestris* који се због високе продуктивности уобичајено користи, познато је да и друге врсте, као што су *Xanthomonas phaseolis*, *Xanthomonas malvacearum*, *Xanthomonas carotae*, *Xanthomonas manihotis* и *Xanthomonas jugandlis*, имају способност производње ксантана (Flickinger and Drew, 1999).

X. campestris pv. *campestris* је фитопатогена бактерија која изазива црну трулеж биљака из рода *Brassica*, који обухвата поврће као што је купус, карфиол, кељ, прокељ, броколи и др. У унутрашњост биљке улазе кроз хидатоду, отворе на ивици листа кроз које биљка избацује вишак воде, изазивају уништавање хлорофила, зачепљење спроводних судова што доводи до труљења. Иако није спороген сматра се да може да се одржи у анабиотичком стању и преко 25 година у сувим условима и собној температури. Произведени полисахарид штити бактерију од штетних утицаја температуре, светлости и бактериофага, а има и улогу у раном стадијуму колонизације ћелија на биљци. Како бактерије немају способност да катаболишу сопствене полисахариде, ксантан не представља резервну хранљиву материју (Born et al., 2005; Glazer and Nikaido, 2007).

Врсте рода *Xanthomonas* су грам-негативне, штапићасте бактерије заобљених крајева, ширине 0,4-0,7 μm и дужине 0,7-1,8 μm које се најчешће јављају као појединачне или у пару, али су запажени и ланци бактерија. Покретне су и имају једну поларну флагелу, дужине 1,7-3,0 μm (Flickinger and Drew, 1999; Garcia-Ochoa et al., 2000a).

Колоније су обично жуте боје од пигмента ксантомонадина док неки сојеви производе мрки пигмент који дифундује у подлогу. Оне су глатке и бутерне конзистенције, а на подлози са глукозом слузасте, испупчене и сјајне.

Метаболизам ових бактерија је искључиво респираторан и молекулски кисеоник је акцептор електрона. Каталаза су позитивни, а оксидаза негативни или слабо позитивни. Нитрате не редукују. Водоник-сулфид позитивни, а индол негативни.

Бактерије рода *Xanthomonas* су хемоорганотрофи, минималне потребе за раст су комплексне и у синтетичкој подлози поред минерала, амонијум нитрата и одговарајућег извора угљеника као што је глукоза, за већину сојева су неопходне аминокиселине. Најчешће метионин или глутамат, али понекад и оба. Аспарагин им може бити извор азота у подлози са глукозом (као извором угљеника), али он не може бити истовремено извор азота и извор угљеника. Ова особина се користи за диференцирање врста из рода *Xanthomonas* од жутих сојева из породице *Enterobacteriaceae* и неких сојева рода *Pseudomonas* који то могу. Киселину без гаса производе из арабинозе, ксилозе, глукозе, галактозе, манозе, лактозе, малтозе, сахарозе, декстрина, рафинозе, глицерина и манитола, а не из скроба, ексулина, дулците, рамнозе, инулина, адонитола, сорбитола, *m*-инозитола и салицина. Већина сојева брзо хидролизује скроб и tween 80 (Додић, 2000; Garcia-Ochoa et al., 2000a; Whitman, 2009).

Бактерије су облигатни аероби чији је температурни оптимум 25-30°C, а максимална температура на којој још испољавају раст 35-39°C. Ни један сој не расте на 5°C, већина расте на 7°C, а неки су неспособни да расту испод 9°C.

3.2.2. САСТАВ ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ

Чињеница да различити микроорганизми користе различите изворе угљеника и енергије, јасно указује на то да не поседују сви микроорганизми односно све ћелије исте унутрашње хемијске механизме. Различите фазе раста или промене састава хранљиве подлоге, на пример коришћењем различитих супстрата или лимитирајућих нутријената, не утичу на примарну структуру молекула али утичу на структуру бочних ланаца, молекулску масу и принос (Rosalam and England., 2006). Хранљиве подлоге и култивациони медијуми које се користе у различитим фазама производње ксантана морају се разликовати по свом саставу јер метаболизам производног микроорганизма поставља различите захтеве у погледу нутријената у зависности од тога која је фаза процеса производње ксантана у току.

Хранљиве подлоге које се користе за освежавање производног микроорганизма и припрему инокулума својим саставом подстичу умножавање биомасе *Xanthomonas campestris*. Оне садрже ферментабилне шећере као што су глукоза, фруктоза, сахароза или малтоза, лако усвојиве неорганске и органске изворе азота какви су амонијумове соли и пептон или триптон, изворе калијума и фосфора у облику калијумове соли фосфорне киселине и изворе магнезијума и сумпора у облику магнезијумове соли сумпорне киселине. Полусинтетичке хранљиве подлоге или култивациони медијуми комплексног састава, за чију се припрему користе јефтине сировине, примењују се за производњу ксантана, а и у завршној фази припреме инокулума. Извори угљеника у овим подлогама су техничка глукоза, комерцијални шећер, меласа, јечмени слад, јаворов сируп, хидролизат зрна житарица, и др. (Додић и Граховац, 2013).

Када се као извор угљеника користи глукоза, њен највећи део се конвертује у биополимер, док остатак обезбеђује енергију потребну за раст ћелија и полимеризацију молекула. Концентрација глукозе у подлози значајно утиче на принос ксантана и не препоручује се да прелази 5% (Flickinger and Drew, 1999; Lachke, 2004). Када се користи 1% глукозе конверзија је скоро квантитативна при чему се 90% преводи у биополимер, а како се повећава концентрација глукозе, принос израчунат на почетну концентрацију расположиве глукозе се значајно смањује. Оптималном концентрацијом глукозе у подлози се сматра од 2% до 4% (Garcia-Ochoa et al., 2000a). Биосинтеза ксантана се може изводити на подлогама које уместо глукозе као извор угљеника садрже различите шећере, као што су сахароза, малтоза, фруктоза, ксилоза, арабиноза, галактоза, лактоза, инозитол, сорбитол или скроб (Leela and Sharma, 2000).

Азот је неопходан за раст ћелија и производњу ензима који учествују у катаболичким и анаболичким процесима. Он не представља структурну компоненту ксантана и за интензиван раст ћелија је потребно да извор азота не буде лимитирајући супстрат, док је вишак угљеника а ниска концентрација азота потребна за продукцију биополимера са погодним реолошким карактеристикама. Извори азота у хранљивој подлози могу бити органски и неоргански. Као органски извори азота се користе триптон и пептон, али само за почетне фазе умножавања културе због високе цене, док се од неорганских извора азота могу користити амонијум соли и разни нитрати. Соли амонијака имају позитиван утицај на акумулацију биомасе, док се применом нитрата добија већи принос ксантана (Garcia-Ochoa et al., 2000a; Rosalam and England, 2006)

Калијум, магнезијум и фосфор у подлоге за производњу ксантана додају се у облику лако растворних соли какве су сулфати и фосфати. Ови елементи дозирају се у прецизно дефинисаној количини јер се лимитирајући нутријенти чијим се ицрпљењем у биореактору минимизује умножавање ћелија и фаворизује биосинтеза ксантана. Подлоге за производњу ксантана често садрже и лимунску киселину, соли гвожђа, мангана и друге потребне нутријенте и обавезно средство за сузбијање пене. Како наведени састојци у значајној мери утичу на квалитет и количину произведеног биополимера њихов садржај је добро чувана и патентом заштићена тајна произвођача (Додић и Граховац, 2013).

ОТПАДНЕ ВОДЕ ИНДУСТРИЈЕ КАО ОСНОВА КУЛТИВАЦИОНОГ МЕДИЈУМА ЗА ПРОИЗВОДЊУ КСАНТАНА

Научна и стручна литература наводи да је производња ксантана, применом бактерија које припадају роду *Xanthomonas*, успешно изведена на култивационим медијумима који као основу садрже различите индустријске ефлуенте и споредне производе. Yoo и Harcum (1999) су испитивали оправданост коришћења отпада репиних резанаца као додатног супстрата за производњу ксантана помоћу *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Faria и сарадници (2011) су произвели ксантан помоћу *X. campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 коришћењем разређене култивационе течности добијене из прераде шећерне трске. Производњу ксантана на култивационом медијуму који је као основу садржао сирови касава скроб као извор угљеника применом соја *Xanthomonas campestris* TISTR 840 су испитали Kerdsup и сарадници (2011). Bilanović и сарадници (2011) су испитивали успешност биопроцеса када се за производњу ксантана користе отпаци добијени приликом прераде кромпира, док су могућност производње ксантана применом ефлуената из месне индустрије као основе култивационог медијума испитали Kurbanoglu и Kurbanoglu (2007).

Gilani и сарадници (2011a) су испитивали могућност производње ксантана применом производног микроорганизама *Xanthomonas campestris* PTCC 1473 користећи сурутку као основу култивационог медијума. Употребљена лактоза је добијена предтретманом сурутке, а примењени медијум је имао следећи састав: лактоза 30 g/l, екстракт квасца 5,0 g/l и раствор за обогаћивање 3,0 ml (састоји се од [g/l]: 3 KН₂PO₄, 0,6 MgCl₂, 0,1 Na₂SO₄, 0,006 H₃BO₃, 0,006 ZnO, 0,02 FeCl₃ x 6H₂O, 0,02 CaCO₃). Остварени принос је износио 16,5 g/l. Могућност примене овог ефлуента су такође анализирали Silva и сарадници (2009), који су испитивали производњу и карактеристике ксантан гуме добијене помоћу два соја *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 1230 и *Xanthomonas campestris manihotis* 1182, при чему је као извор азота и угљеника примењена сурутка моцарела сира, у течном облику, непосредно након прикупљања. Култивациони медијум је обогаћен са 0,1% MgSO₄x7H₂O и 2,0% K₂HPO₄, а максимална количина добијеног ксантана на крају биосинтезе је износила 25 g/l.

Moreno и сарадници (1998) су испитивали киселе хидролизате отпада од четири различите врсте поврћа као основе култивационог медијума у производњи ксантана, применом сојева *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 и *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 S4-LII. Испитивани су кисели хидролизати диње, лубенице, парадајза и краставца који су добијени мешањем 10% v/v уситњеног отпада и 1,5 % сумпорне киселине. Највећа количина ксантана је добијена применом култивационог медијума са хидролизатом диње. Такође, карактеристике добијених ксантана су упоређене са комерцијалним ксантаном при чему се показало да имају веома сличан хемијски састав.

Moosavi-Nasab и сарадници (2008) су испитали производњу ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадни сируп урми и на култивационом медијуму са сахарозним сирупом. Добијени резултати су показали да је у примењеним експерименталним условима добијена већа количина ксантана применом отпадног сирупа из прерде урми (8,9 g/l) него применом сахарозног сирупа као основе медијума (1,8 g/l). Такође, Salah и сарадници (2010) су у својим истраживањима потврдили могућност примене отпада из производње сока од урми као основе култивационог медијума у производњи ксантана.

У литератури се могу пронаћи различита истраживања која су обухватила испитивање успешности производње ксантана применом медијума који као основу садржи меласу шећерне репе. Gilani и сарадници (2011b) су испитали утицај концентрације меласе као основног састојка култивационог медијума на принос ксантана. Ксантан је произведен дисконтинуално применом *X. campestris* PTCC 1473 на култивационим медијумима код којих је вариран садржај глукозе (20-40 g/l) добијене хидролизом меласе шећерне репе и у које је додато 5 g/l екстракта квасца као и 3 ml раствора за обогаћивање (састоји се од [g/l]: 3,0 KН₂PO₄, 0,6 MgCl₂, 0,1 Na₂SO₄, 0,006 ZnO, 0,02 FeCl₃ x 6H₂O, 0,02 CaCO₃). Максимална количина ксантана од 17,1 g/l је оставрена при садржају шећера од 30 g/l. Moosavi-Nasab и сарадници (2010) су за производњу ксантана применили 10% раствор меласе шећерне репе као извор угљеника у култивационом медијуму који је додатно обогаћен са 6,0 g/l NH₄NO₃, 4,0 g/l KН₂PO₄, 0,2 g/l Mg₂SO₄ и 5,0 g/l NaCl. Истраживања која су извели Mabrouk и сарадници (2013) су показала да је приликом производње ксантана оптималан састав култивационог медијума следећи: 100 g/l меласе шећерне репе, 10 g/l KН₂PO₄, 0,3 g/l MgCl₂ x 6H₂O, 0,5 g/l лимунске киселине, 0,006g/l CaCl₂ x 2H₂O и 0,2 g/l NH₄Cl, при чему је добијена количина ксантана од 28 g/l. Такође, истраживања која су објавили Kalogiannis и сарадници (2003) су приказала производњу ксантана применом меласе шећере репе као основе медијума уз добијање високог приноса ксантана.

Lopez и Ramos-Cormenzana (1996) су испитивали могућност примене отпада из производње маслиновог уља (ОМВ) као основе култивационог медијума за производњу ксантана при чему је као производни микроорганизам примењен *X. campestris* NRRL B-1459 S4-LII. Раст биомасе и производња ксантана на разблаженом ОМВ као једином извору хранљивих материја је добијен при концентрацијама ОМВ испод 60%, дајући максималну количину ксантана од 4,4 g/l при концентрацији од 30-40%. Додавање азота и/или минералних соли је довело до повећања приноса на 7,7 g/l.

3.2.3. ПРОИЗВОДНИ ПОСТУПАК И ТЕХНИЧКО-ТЕХНОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ ПРОИЗВОДЊЕ КСАНТАНА

У уобичајеној произвођачкој пракси сви изолати производних сојева *Xanthomonas campestris* се одржавају на полуврстим хранљивим подлогама са додатком калцијум-карбоната, уз обавезно месечно пресејавање. Освежавање производног микроорганизма из збирке култура на полуврстој хранљивој подлози за освежавање је прва фаза. Поступак је аеробан, стационаран, одвија се на температури од 24-26°C и траје 20-24h. Успешно освежена култура подразумева да се на подлози након инкубације, осим ћелија налази и ксантан кога ћелије *Xanthomonas campestris* продукују као секундарни метаболит.

Умножавање ћелија *Xanthomonas campestris* започиње суспендовањем културе са полуврсте хранљиве подлоге за освежавање за коју се сматра да је довољно активна, у течну подлогу за умножавање. Инкубација се одвија на температури од 28°C, у трајању од око 24h.

Након инокулације и хомогенизације течна подлога је, у овој фази поступка, неједнако замућена. Кроз извесно време инкубације течни инокулуми постају вискозни и мутни. Да би се добили инокулуми приближног квалитета, прибегава се вишеструком пресејавању јер се на тај начин производна култура доводи у стање максималне физиолошке активности и може се претпоставити да ће под истим условима ћелије у различитим инокулумима бити у истој фази раста.

Потребна количина инокулума за успешно одвијање следеће фазе у производњи ксантана износи 5-10% запремине култивационе течности. Уколико инокулум садржи довољан број вијабилних ћелија у одговарајућем физиолошком стадијуму величина инокулума (у горенаведеним границама) нема значајан ефекат на количину и квалитет ксантана.

Биосинтеза ксантана се у индустрији одвија као дисконтинуални процес са слободним ћелијама. Када су ћелије производног микроорганизма током припреме инокулума добро прилагођене условима у биореактору и уколико хранљива подлога садржи све нутријенте неопходне за њихов брзи раст ток процеса јасно је подељен на две фазе. У првој фази долази до интензивног раста и умножавања ћелија са веома малом количином продукованог ксантана (експоненцијална фаза раста, тропофаза). У другој фази број ћелија се мења у малој мери, а настаје највећи део укупне количине биополимера (стационарна фаза раста, идиофаза). При крају процеса долази до смањења садржаја биомасе услед лизе ћелија, што је у индустријским условима непожељно и максимално се скраћује па је њено трајање занемарљиво (Додић и Граховац, 2013).

За успешно и ефикасно извођење биопроцеса производње ксантана велики значај имају услови производње, као што су температура, вредност рН, аерација, мешање и др.

За производњу ксантана примењују су температуре између 25-34°C, а интервал између 28-30°C је уобичајен. Максимална продукција одвија се на температури од 31-33°C, док је за висок садржај пирувата у молекулу ксантана најбоља температура између 27-31°C. Поред тога, показано је да на оптималну температуру производње утиче и састав култивационог медијума (Garcia-Ochoa et al., 2000a; Palaniraj and Jayaraman, 2011).

За раст производног микроорганизма оптимална вредност рН се налази у неутралном подручју, између 6,5 и 7,5, па се у том опсегу иницијално и подешава (Garcia-Ochoa et al., 2000a). Током производње ксантана вредност рН се смањује услед киселих функционалних група присутних у ксантану (Vorges et al., 2008) и продукције органских киселина, а критична вредност рН за биосинтезу ксантана је 5,5 (Додић и Граховац, 2013). Истраживања су показала да контролисање вредности рН током процеса побољшава раст ћелија али нема утицај на производњу ксантана (Garcia-Ochoa et al., 1996).

Један од највећих проблема при индустријској производњи ксантана јесте пораст вискозитета култивационог медијума што утиче на доступност кисеоника и нутријента. С обзиром да је производни микроорганизам облигатни аероб пренос масе кисеоника значајно утиче на принос ксантана. У индустријској производњи ксантана најчешће се користе биореактори са механичким мешањем како би се у вискозном систему обезбедила одговарајућа аерација и мешања (Becker et al., 1998).

Висока продуктивност соја и велика молекулска маса ксантана је обезбеђена добрим преносом масе кисеоника и одсуством зона застоја у биореактору. Интензивна аерација се обезбеђује мешањем подлоге и провођењем ваздуха. Садржај уграђеног пирувата у биополимер у директној је вези са количином доступног кисеоника. Са повећањем степена засићења подлоге кисеоником дистрибуција молекулске масе се проширује ка већим вредностима, што мења реолошке параметре ферментационе течности. У продукционој фази критичан ниво кисеоника је између 6 и 10%, а испод 6% и продукција ксантана и специфична брзина усвајања кисеоника од стране производне културе значајно се смањују.

Утицај брзине мешања на ток биосинтезе ксантана уско је везан са количином расположивог кисеоника. У почетној фази култивације, за раст и размножавање ћелија, није неопходна екстремно велика количина кисеоника, па је брзина мешања мала, док је у фази интензивне продукције ксантана услед промене вискозитета култивационе течности и повећане потребе ћелија за кисеоником неопходно је повећање брзине мешања. Утврђено је да се са повећањем брзине мешања повећава молекулска маса насталог ксантана (Додић и Граховац, 2013).

Захтеви за стерилношћу биопроцеса производње ксантана су веома строги. Контаминација се спречава употребом чисте културе производног микроорганизма, стерилизацијом хранљиве подлоге, процесне опреме, биореактора и свих компонената које се накнадно додају у биореактор, као и одржавањем стерилних услова током трајања биотехнолошког процеса (Барас и сар., 2009).

3.2.4. ИЗДВАЈАЊЕ И ПРЕЧИШЋАВАЊЕ ПРОИЗВОДА

Издвајање и пречишћавање ксантана из култивационе течности је најчешће тежак и скуп поступак. Од укупних трошкова производње, око 50% чине трошкови издвајања ксантана из култивационе течности. Основни кораци у овом поступку обухватају деактивирање или уклањање микробних ћелија, преципитацију биополимера, дехидратацију, сушење и млевење. Цео поступак мора бити изведен без деградације биополимера а коначан производ је најчешће прах или концентровани раствор (García-Ochoa et al., 2000a). Техника која се примењује одређена је крајњом применом производа, односно зависи од захтева које намена ксантана поставља пред његов квалитет. Уколико примена ксантана не захтева накнадно пречишћавање издвојеног биополимера, вода се из култивационе течности испарава директно, сушењем у флуидизованом слоју или сушењем на ваљцима. Овакав производ је техничког квалитета и као такав погодан је само за примену у нафтној индустрији (García-Ochoa et al., 2000a; Додић и Граховац, 2013).

Поступак издвајања и пречишћавања започиње операцијом која за циљ има да уклони или инактивира ћелије прозводног микроорганизама, обзиром да је *Xanthomonas campestris* фитопатогена бактерија. Услед великог вискозитета добијених култивационих течности сепарација ћелија је веома скуп поступак у индустријској производњи (Becker et al., 1998). У зависности од крајње намене произведеног биополимера, у ове сврхе могу да се користе различити поступци као што су термички третман, третман биоцидима или стерилна филтрација.

Најчешће се за издвајање ксантана из култивационе течности примењује таложење, које је могуће захваљујући поливалентном карактеру биополимера. Овај процес могуће је извести додатком моно- или поливалентних соли или органских растварача као таложних агенаса. Таложење солима ограничено је чистоћом и ценом. Уколико је биополимер издвојен додатком соли не препоручује се његова примена у прехранбеној индустрији. Када су у питању органски растварачи, за таложење ксантана се користе алкохоли мале молекулске масе (метанол, етанол, изопропанол или терц-бутанол) уз додатак електролита, а овако издвојен биополимер намењен је прехранбеној индустрији. Алкохоли мале молекулске масе и ацетон се додају у култивациону течност не само ради његове преципитације већ и за испирање односно уклањање различитих нечистоћа, као што су соли и ћелије. Ксантан се таложи при садржају етанола од око 55% и садржају zasiћеног раствора калијум-хлорида од 1% у таложној смеси чија је оптимална температура 15°C. Овим поступком се постиже и делимично пречишћавање талоба, а потреба за великим утрошком алкохола подразумева његово рециклирање. Сирови биополимер се може сушити на ротационим или сушницама са распршивањем. Према потребама тржишта уситњава се у млину са чекићем и пакује. На тржиште се пласира у облику праха, пасте или суспензије (García-Ochoa et al., 2000a; Додић и Граховац, 2013).

3.2.5. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛА И ОСОБИНЕ РАСТВОРА КСАНТАНА

Молекул ксантана је разгранат и састоји се од основног и бочних ланаца, односно од линеарног дела и бочних грана. Молекул се састоји од D-глукозе, D-манозе и D-глукуроноске киселине чији је моларни однос 2,8:2,0:2,0. Молекули глукозе су повезани β -(1-4)-гликозидном везом и формирају основни целулозни ланац. Сваки други молекул β -D-глукопиранозилске јединице на месту О-3 повезан је са β -D-манопиранозил-(1-4)- β -D-глукуронопиранозил-(1-2)-6-О-ацетил- β -D-

манопиранозил трисахаридном јединицом. Присуство ацетатних и пируватних група полисахариду даје анјонски карактер. Остатак пирогрођане киселине, пируват, може бити везан за С-4 и С-6 атом терминалне β -D-манозе кеталном везом док ацетил групе могу бити везане на С-6 атом унутрашње (нетерминалне) α -D-манозе. Ниво супституције пирувата и ацетата у молекулу ксантана зависи од услова раста, услова производње, као и коришћеног соја *Xanthomonas sp.* У просеку, готово половина терминалне манозе има везан пируват. Број и позиција ацетатних и пируватних остатака ствара одређену неправилност у иначе уређеној структури. Најчешће степен супституције пирувата износи од 30 до 40 %, а ацетата од 60 до 70 %. Познато је да може доћи до одступања у континуитету бочног ланца, због чега делови основног ланца остају "голи" или им бочни ланци недостају што утиче на промене физичких особина полисахарида (Sandford and Baird, 1983; Sutherland, 1990; Casas et al., 2000; Garcia-Ochoa et al., 2000a; Born et al., 2005).

Важна карактеристика раствора ксантана је његово реолошко понашање. При веома малим брзинама смицања или при мировању, раствор ксантана је изразито вискозан. Са порастом брзине смицања, вискозитет се смањује, много брже при мањим, него при великим брзинама смицања.

Индустријски значај раствора ксантана се базира на могућности да контролише реологију водених система. Ксантан је потпуно растворљив у хладној и топлој води, при чему настају веома вискозни раствори и при ниским концентрацијама. Ова способност га чини веома ефикасним угушћивачем и стабилизатором. Раствори ксантана су веома отпорни на промене вредности рН, односно стабилни су и у киселој и у базној средини. Вискозитет раствора ксантана је константна у интервалу вредности рН од 1 до 13. На вредностима рН већим од 9, ксантан се постепено деацетиљује али то не утиче на особине раствора. Такође, вискозитет воденог раствора ксантана је уједначен у широком интервалу температуре. На вискозност не утиче вредност температуре од тачке замрзавања до тачке кључања воде. Стога су реолошке карактеристике производа стабилне без обзира да ли је чуван у фрижидеру, на собној температури или је загреван.

Утицај електролита на растворе ксантана зависи од њихове концентрације. Уколико је концентрација раствора мања од 0,15%, додаток електролита (NaCl) изазива постепено смањење вискозитета, док при великим концентрацијама раствора ксантана додаток електролита има супротан ефекат. Најбољи вискозитет раствора се постиже при концентрацијама NaCl од 0,02 до 0,07 % и изнад ове вредности даље повећање концентрације електролита нема значајан утицај на вискозитет. Соли магнезијума и калцијума имају сличан утицај на вискозитет. Само при високим вредностима рН, већим од 10 рН јединица, ксантан има тенденцију да формира гелове у присуству двовалентних катјона. Тривалентни катјони, као што су алуминијум и гвожђе, формирају гелове при киселим или неутралним вредностима рН. Желирање се може избећи додатком моновалентних соли метала (Sharma et al., 2006).

Вискозитет раствора ксантана зависи од примарне структура ксантана. Резултати различитих студија показују да пораст садржаја пирувата у ксантану доводи до повећања вискозитета (Smith et al., 1981; Cheetham and Norma, 1989; Hassler and Doherty, 1990). Између садржаја пирувата и вискозитета не постоји пропорционална веза, већ долази до наглог пораста вредности вискозитета при концентрацијама пирувата између 2 и 3 %. Вискозитет раствора ксантана који садржи мале количине пирувата се не мења додатком соли (Cheetham and Norma, 1989). Утврђено је да ксантан без ацетата има већу вискозност у односу на нативни ксантан (Sworn, 2011).

Компатибилан је са великим бројем материјала; може се растворити у многим веома киселим, базним, алкохолним и системима различитог састава. Ксантан је такође компатибилан са већином других комерцијалних згушњивача као што су натријумалгинат, карбокси-метилцелулоза и скроб. Реагује са галактомананима као што су гуар гума и гума рогача. Комбинацијом ових полимера долази до синергизма вискозитета што значи да је њихова заједничка вискозност већа него сума вискозитета било које гуме посебно (Sharma et al., 2006).

Ксантан је отпоран на деградацију различитим ензимима као што су протеазе, целулазе, хемицелулазе, пектиназе и амилазе. Међутим, потпуно је биодеградабилан и може бити деполимеризован ензимима које под одређеним условима производе неки микроорганизми. Ксантан деградирају и јаке оксидујуће супстанце, као што су пероксиди и персулфати (Sharma et al., 2006). Такође, раствара се у 8 % раствору сулфитне, нитратне и ацетилне киселине, 10 % хидрохлоридној киселини и 25 % фосфатној киселини (Glazer and Nikaido, 2007).

3.2.6. ПРИМЕНА БИОПОЛИМЕРА КСАНТАНА

Биополимер ксантан има широку примену у многим гранама индустрије (табела 3.3) због погодних реолошких особина и псеудопластичног понашања његових водених раствора у широком опсегу температура и вредности pH (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Табела 3.3. Различите примене ксантана

	Количина (%)	Функција ксантана
Употреба у производњи хране		
Прелив за салате	0,1-0,5	Обезбеђује бољу течљивост и добро везивање, суспендујући агенс
Пекарски производи	0,05-0,3	Везује воду, побољшава текстуру
Напици	0,05-0,2	Побољшава осећај у устима: суспендује воћну пулпу
Готова јела	0,1-0,3	Стабилизатор, инхибира синерезу
Супе, сосеви и умаци	0,05-0,5	Побољшава температурну стабилност, спречава раздвајање
Млечни производи	0,05-0,2	Инхибира синерезу, стабилизује емулзије
Месни производи	0,2-0,5	Везује воду, инхибира синерезу
Употреба за личну негу		
Пасте за зубе	0,7-1,0	Олакшава истискивање
Креме и лосиони	0,2-0,5	Стабилизује емулзије, даје кремасту конзистенцију
Шампони	0,2-0,5	Контролише реологију, суспендује нерастворне делове
Индустријска примена		
Хемикалије у пољопривреди	0,1-0,3	Суспендује активне састојке, контролише везивање
Средства за чишћење	0,2-0,7	Обезбеђује стабилност pH, продужава време контакта
Средства за полирање	0,2-0,7	Суспендује абразивне компоненте
Боје на бази воде	0,1-0,3	Контролише реологију и пенетрацију
Штампање текстила	0,2-0,5	Побољшава обраду, контролише миграцију боје
Адхезиви	0,1-0,3	Контролише реологију и пенетрацију
Папирна индустрија	0,1-0,2	Побољшање суспендовања и контрола реологије
Керамичке глазуре	0,3-0,5	Ефективно суспендује чврсте честице
Бушење нафте	0,1-0,4	Обезбеђује стабилност према соли и температури
Повећање количине сирове нафте	0,05-0,2	Супстанца за контролу покретљивости
Фармацеутици		
Суспензије и емулзије	0,1-0,5	Омогућава добру сабилност и контролу протока
Таблете	1,0-3,0	Успорава ослобађање лекова

Ксантан се највише користи у прехранбеној индустрији као средство за стабилизацију и угушћивање чоколада и крема. Многи прехранбени производи захтевају јединствену текстуру, вискозитет, изглед и неке друге карактеристике, које се постижу додатком ксантана у производ. Пекарским производима се додаје како би им побољшао везивање воде и продужио рок трајања тестима. У одређеним производима, без промене изгледа и укуса се користи као замена за беланце. Додаје се у воћна пића као стабилизатор суспензија и даје им задовољавајући изглед и текстуру. Поред тога, побољшава им вискозитет, утиче на стабилност при чувању, побољшава пренос топлоте при обради и утиче на укус.

Ксантан има важну улогу и у хемијској индустрији, при производњи гелова, пасте за зубе и у припреми неких експлозива. Због својих реолошких карактеристика се користи у петрохемијској индустрији приликом излуживања нафтних бушотина или приликом чишћења цеви. Додаје се хербицидима, фунгицидима и инсектицидима, јер им побољшава вискозитет и омогућује боље налегање на биљку. Такође, ксантан се додаје у фабрике, шампоне, креме и разне козметичке препарате као стабилизатор емулзија и побољшивач текстуре датог производа (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

У фармацеутској индустрији се користи за суспендовање неких препарата, као што су антибиотици, а може се користити и за стабилизацију крема које садрже фармацеутске препарате. Многа испитивања се врше за утврђивање употребе ксантана у препаратима у којима је важно контролисано отпуштање неких једињења, растварање таблета и различитих препарата (Flickinger and Drew, 1999).

3.3. МОДЕЛОВАЊЕ И СИМУЛАЦИЈА БИОПРОЦЕСА

Моделовање биопроцеса које обухвата његово дефинисање математичким једначинама и симулација која представља решавање једначина модела биопроцеса, побољшавају увид и разумевање самог биопроцеса и помаже у идентификацији његових критичних тачака. Приликом развијања модела, неопходно је да је предложена примена модела јасна и да се модел развија на основу ње. Увођењем датих модела у различите програме за симулацију биопроцеса, олакшава се идентификација потенцијалних побољшања или могућих потешкоћа које могу настати у самом производном процесу.

Моделовање биопроцеса има велики значај при пројектовању и развоју новог биотехнолошког процеса. На слици 3.2. шематски је приказан процес пројектовања биопроцеса на основу ког се може сагледати његова комплексност, с обзиром да више корака теку паралелно и утичу једни на друге, као и место моделовања биопроцеса у целокупном пројектовању.

Приликом развоја односно пројектовања биопроцеса, први подаци о биопроцесу који постану доступни се могу искористити за његово моделовање, са циљем прорачуна материјалних биланса, потрошње енергије, потреба радне снаге и опреме за производни процес. Поред тога, битно је нагласити да се модели унапређују са сваким кораком у процесу пројектовања. Утицај могућих промена у биопроцесу, претпоставке и процене направљене помоћу моделовања, морају се проверити анализом несигурности. Такође, од најранијих фаза развоја, експериментални и резултати моделовања се користе за анализу економских и еколошких апсеката, како би се реализовао одржив биопроцес.



Слика 3.2. Кораци у пројектовању биотехнолошког процеса, од идеје о производу до производног постројења (ДТП – дијаграм тока процеса)

Моделовање биопроцеса се извршава у неколико корака који обухватају дефинисање циља и границе модела, прикупљање података, постављање модела биопроцеса, дефинисање дијаграма тока и операција, као и прикупљање документације. За успешно моделовање неопходно је дефинисати циљ моделовања на самом почетку, што укључује спецификацију крајњег производа, величину постројења, биокатализатор и границе модела. Сваки модел мора да укључи све неопходне процесне кораке, али тако да се сложеност биопроцеса сведе на минимум. Након дефинисања циљева и граница модела, морају се прикупити одговарајући подаци. Могу се искористити подаци из сопствених истраживања али веома често их је неопходно допунити екстерним, што изискује стручну процену поузданости и применљивости података.

Најчешће се моделовање започиње биореакцијом. Из прикупљених података и општег знања о биопроцесу изводе се реакционе једначине и услови. Прво се наводе сировине потребне за примењени биокатализатор, а потом се одређују параметри попут приноса, култивационог времена, концентрације крајњег производа, настанка споредних производа, итд. Подаци о реакцијама су или унапред познати или се примењује кинетички или стехиометријски модел за прорачун ових параметара. Додатно, морају се дефинисати реакциони услови за модел биопроцеса. Приликом постављања дијаграма тока биопроцеса све процедуре и кораци модела постају одређени. Свака операција мора бити описана у моделу, а параметри модела морају бити дефинисани. Модел се формира и на крају преноси у одговарајући софтвер, где се изводи симулација. Поред побољшања општег разумевања биопроцеса, резултати симулације се користе за процену одрживости и оптимизацију (Heinzle et al., 2006; Вучуровић и сар., 2012; Вучуровић, 2015).

3.3.1. МАТЕМАТИЧКО МОДЕЛОВАЊЕ

Одавно су чињени покушаји да се биопроцеси опишу математички али тек недавно, захваљујући сакупљеним неопходним знањима о биохемијским реакцијама у живој ћелији, мерним инструментима и биореакторима, као и развијеном математичком апарату и рачунарској опреми и програмима, учињени напори су довели до успешног моделовања микробиолошких процеса. Развијени математички модели су се показали врло практичним и корисним за различите аспекте биохемијског инжењерства, као што су: повећање размера, контрола, симулација и оптимизација микробиолошких процеса (Барас и сар., 2009). Ћелијско понашање током биопроцеса има комплексност која се не може поредити са хемијским процесима и стога га је веома тешко предвидети. Узимајући у обзир да је ћелијски раст веома комплексан, пре развоја било каквог модела, неопходно га је драстично поједноставити (Lim and Shin, 2013).

Математички модели су математички описи биопроцеса који, иако често на упрошћеном нивоу, довољно адекватно представљају њихову природу. Обично су то групе математичких формула или једначина које описују битне промене у току биопроцеса.

Математички модели се „праве“ из више разлога од којих су најважнији (Барас и сар., 2009):

- предвиђање конверзије супстрата или производности биопроцеса,
- испитивање рада постројења у различитим условима,
- пројектовање биопроцеса,
- повећање размера биопроцеса,
- модификације у циљу унапређења биопроцеса,
- оптимизовање биопроцеса,
- компјутерско симулирање биопроцеса,
- идентификовање непознатих утицајних фактора и
- контрола процеса.

Уопштено, модели се могу поделити на феноменолошке (неструктурне) и механистичке (структурне) моделе. Феноменолошки модели не узимају у обзир различите ћелијске процесе који се одигравају, као и специфичне ензиме и компоненте ћелијске структуре. Ови неструктурни модели дефинишу раст биомасе као функцију макроскопских променљивих и не узимају у обзир физиолошке промене које се дешавају у самој ћелији посматраног микроорганизама. Структурни модели, с друге стране, посматрају ћелију као сложен систем и базирају се на опису реалних физиолошких промена који се у њој одигравају. Они се заснивају на ћелијским механизмима и узимају у обзир различите ћелијске процесе који зависе од активности ензима и структурних компоненти као што су рибозоми, митохондрије, затим макромолекулске компоненте као што су протеини, ДНА, РНА и угљенихидрати. Предност овако високоструктурних модела јесте потенцијал за моделовање међусобних интеракција метаболичких процеса и предвиђање утицаја интерних генетичких модификација и спољашњих неповољних утицаја на целокупно функционисање ћелија. Недостатак представља отежано одређивање кинетике и кинетичких константи индивидуалних реакција с обзиром да многе ћелијске компоненте нису лако мерљиве, као и манипулација великим бројем билансних једначина које се добијају. Иако сама природа биолошких система може захтевати комплексне моделе, од великог је значаја управо то избегавати првенствено зато што је у супротности са самом сврхом моделовања, а поред тога додатно отежава предвиђање ћелијског понашања (Lim and Shin, 2013).

Начелно, употреба математичког модела микробиолошког процеса омогућава биохемијском инжењеру да своје идеје у вези, на пример, са пројектовањем, повећањем размера или унапређењем биопроцеса, проверава на моделу, а не на постројењу, чиме се значајно смањују ризици од губитака времена и трошкова експериментисања. Математички модели којима се остварују наведени циљеви могу бити потпуно различити. Тако, на пример, за пројектовање, повећање размера и симулацију биопроцеса потребни су прилично детаљни механистички модели, док су за контролу процеса довољни релативно једноставни модели.

Поступак постављања и решавања математичког модела биопроцеса исти је, у принципу, као за било који хемијски процес. Математички модел се увек прави на основу добро формулисаног вербалног модела. Математички модели могу бити врло једноставни, али и врло сложени. Једноставни модели се лако решавају али не пружају довољно података о биопроцесу. Сложени модели дају бољи опис биопроцеса, али имају велике проблеме у добијању вредности параметара. Да би модел био што једноставнији, препоручује се да моделовање почне узимањем у обзир само најважнијих феномена у сложеном биолошком систему. Користећи литературне или експерименталне податке бирају се значајне процесне променљиве и формулишу одговарајуће математичке једначине, које чине математички модел биопроцеса. Овај модел укључује конститутивне и билансне једначине: прве обухватају кинетичке, транспортне и термодинамичке једначине, док друге описују билансе масе, топлоте и количине кретања. Ако је биореактор са идеалним мешањем, билансне једначине се постављају на макронивоу, тј. за цео биореактор.

Начелно, једначине модела су нелинеарне, најчешће диференцијалне једначине. Да би се избегло непотребно усложњавање које ће отежати израчунавања, модел се, ако је могуће, упрошћава до нивоа којим се адекватно описују збивања у биолошком процесу узимањем у обзир само релевантних фактора. Најважније претпоставке које се могу користити при моделовању биопроцеса су да се биланси топлоте и количине кретања не разматрају јер биореактор функционише изотермно због регулације температуре на константном нивоу, а квазистационарна стања се брзо успостављају после евентуалне промене брзине мешања или протока гаса. Сложеност модела може се често умањити поређењем временских константиразличитих механизма. Механизми са временским константама много већим од временске константе процеса могу се изоставити, док су механизми с много мањим временским константама у равнотежи или у квазистационарном стању.

Погодним математичким апаратом решава се систем математичких једначина које чине модел. Решавање једначина значи да се једна или више особина биосистема добије у експлицитном облику. Пожељно је да решења буду аналитичка, јер она омогућују дубље сагледавање природе биопроцеса. Начелно, аналитичка решења се тешко добијају, изузев у случају линеарних једначина. Обично се једначине модела решавају нумеричким методима помоћу рачунара. При коришћењу рачунара, обавезна је провера коректности рачунарског програма.

Након решења једначина модела, испитује се осетљивост модела на параметре модела. Праве вредности кинетичких (максимална специфична брзина раста, сатурациона константа, коефицијенти приноса итд.), транспортних (коефицијент молекулске дифузије, запремински коефицијент преноса масе кисеоника итд.) и термодинамичких (на пример, растворљивост кисеоника) параметара морају бити познате. С обзиром да добијање вредности параметара често временски дуго траје, а њихова важност за модел није подједнака, врши се тзв. анализа осетљивости параметара (Барас и сар., 2009).

КИНЕТИЧКО МОДЕЛОВАЊЕ БИОПРОЦЕСА ПРОИЗВОДЊЕ КСАНТАНА

У биотехнолошким процесима, где су катализатори живе ћелије, истовремено и међусобно повезано се одигравају раст и размножавање ћелија, потрошња супстрата и синтеза примарних и секундарних производа метаболизма. Кинетика ових процеса проучава брзине раста ћелија микроорганизама, потрошњу лимитирајућег супстрата из хранљиве подлоге односно култивационог медијума и настајања производа, као и утицаја фактора околине на њих. Компоненте хранљиве подлоге се преносе из околне средине у ћелију производног микроорганизама, док се различити производи метаболизма и вишак енергије преносе из ћелије у околну средину. Када би се у потпуности математичким релацијама описале све појаве које се дешавају између ћелије, околине и биореактора, добијени математички модел би био веома компликован и готово нерешив. Управо из ових разлога у пракси се користе у одеђеној мери поједностављени модели, који приближно реално описују биотехнолошке процесе. Најчешће се користе модели са идеализованом интеракцијом између биокатализатора, фактора средине и биореактора (Попов, 2000).

Одабир и развој одговарајућег кинетичког модела, за конкретни микроорганизам, би требало да започне са разумевањем његовог понашања и природног станишта. Приликом извођења биотехнолошких процеса, постоје дисконтинуални и континуални режим рада и управо од примењеног режима рада зависиће и временски ток раста посматраног микроорганизма (Faria et al., 2010).

Неструктурни кинетички модели су најједноставнији модели који се користе за моделовање микробиолошких система. Ови модели описују микроорганизме као апстрактни појам који се назива биомаса и која се сматра компонентом или реактантом у испитиваном систему. Неструктурни модели се најчешће користе за моделовање биолошких система због своје једноставности али и довољне тачности за даљу примену. Иако су они једноставнији од структурних модела и стога захтевају и мерење мањег броја компонената, они морају бити у могућности да опишу развој биомасе, супстрата и производа, а најчешће и неког додатног нутријента (García-Ochoa et al., 1995).

Доступна литература показује да је испитивање неструктурних кинетичких модела приликом дисконтинуалне производње ксантана применом производног микроорганизма *Xanthomonas campestris*, изведено од стране многих аутора (Moraine and Rogovin, 1971; Weiss and Ollis, 1980; Pinches and Pallent, 1986; Luong et al., 1988; Schweickart and Quinlan, 1989; Pons et al., 1990; García-Ochoa et al., 1995; Letisse et al., 2003). Примењивани модели, на основу кинетичких једначина које се користе за опис раста и производње жељеног производа, могу се поделити у две групе. Прва група подразумева моделе који изражавају раст производног микроорганизма и производњу жељеног производа као зависност од најзначајнијих нутријената, односно састава хранљиве подлоге, док другу групу чине модели који раст и производњу изражавају у функцији промене биомасе са временом (Faria et al., 2010).

Свеобухватнији кинетички модел такође би требало да укључи и ограничења преноса масе која се јављају услед повећања вискозитета култивационих течности, механичке особине примењене биопроцесне опреме и промене одређених услова са временом трајања биотехнолошког процеса, попут густине ћелијске популације, која доприноси повећаном ћелијском стресу (Faria et al., 2010).

Неколико аутора (Rosalam and England, 2006; Faria et al., 2009; Palaniraj and Jayaraman, 2011; Garcia-Ochoa et al., 1995) је у својим радовима дало веома детаљно објашњење карактеристика структурних и неструктурних кинетичких модела који су примењивани за описивање кинетике биопроцеса производње ксантана. У даљем тексту представљени су одабрани модели који се веома често користе за описивање кинетике биосинтезе ксантана.

За описивање раста микроорганизама током дисконтинуалне култивације могу се применити различити модели, као што су логистичка, модификована Гомперцова једначина или Монодов модел (Guerra et al., 2010). За описивање раста бактерије *Xanthomonas campestris* при производњи ксантана често је примењивана управо логистичка једначина (Weiss and Oilis, 1980; Pinches and Pallent, 1986; Liakopoulou-Kyriakide et al., 1997; Faria et al., 2009; Gilani et al., 2011b). Поред тога, овај модел је у литератури примењен и за описивање раста великог броја различитих микроорганизама, као што је *Aspergillus foetidus* приликом производње таназе (Kuppusamy et al., 2015), *Lactobacillus casei* као производни микроорганизам млечне киселине (Altiok et al., 2006), *Bacillus subtilis* при производњи натокиназе (Vinayagam et al., 2015), *Bacillus licheniformis* као производи микроорганизам алкалне протеазе (Biswanath et al., 2012), *Aspergillus niger* при производњи целулаза и ксиланаза (Villena and Gutiérrez-Correa, 2012), *Aureobasidium pullulans* при производњи биополимера пулулана (Ganduri et al., 2016), *Sphingomonas paucimobilis* при производњи гелана (Wang X et al., 2006), *Bacillus sphaericus* при производњи липазе (Tamilarasan and Kumar, 2011), *Pseudomonas fluorescens* при производњи липазе (Rajendran et al., 2007).

Luedeking-Piret-ов модел (Luedeking and Piret, 1959) је од стране многих аутора примењен за описивање синтезе ксантана (Weiss and Oilis, 1980; Pinches and Pallent, 1986; Gilani et al., 2011b), али и различитих биопроизвода, као што је ензим таназе (Kuppusamy et al., 2015), млечна киселина (Altiok et al., 2006), фибринолитички агенс натокиназа (Vinayagam et al., 2015), алкална протеаза (Biswanath et al., 2012), ензими целулаза и ксиланаза (Villena and Gutiérrez-Correa, 2012), пулулан (Ganduri et al., 2016), гелан (Wang X et al., 2006) и липаза (Tamilarasan and Kumar, 2011; Rajendran et al., 2007).

За описивање кинетике потрошње супстрата током биосинтезе ксантана може се применити модификовани *Luedeking-Piret*-ов модел (Weiss and Oilis, 1980; Pinches and Pallent, 1986; Gilani et al., 2011b). Овај модел је такође примењен и за описивање потрошње супстрата при производњи натокиназе (Vinayagam et al., 2015), пулулана (Ganduri et al., 2016), гелана (Wang X et al., 2006) и липазе (Tamilarasan and Kumar, 2011).

3.3.2. СИМУЛАЦИЈА БИОПРОЦЕСА

Формулисање математичког модела треба да помогне да се биопроцес потпуније биохемијски разуме. Ако су сви параметри модела, као што су: константе брзине реакција и друге константе, познати, онда се модел може користити за предвиђања резултата биопроцеса. Начин описивања биопроцеса путем решења математичких једначина оваквог модела биопроцеса, која су добијена на основу почетних услова, тј. вредности параметара модела, представља компјутерску симулацију биопроцеса.

За симулацију биопроцеса модели имају велики практични значај. Они се користе за планирање експеримената, интерполацију и екстраполацију експерименталних резултата, као и објашњење природе биопроцеса. Извођење експеримената на рачунару, помоћу одговарајућих програма, за неколико редова величине је брже и економичније од извођења експеримената у лабораторији. Сложеност модела који се користе у ове сврхе разликује се зависно од њихове намене. Тако, на пример, за одређивање граничних услова експерименталног испитивања понашања континуалних биосистема могу се користити једноставнији модели. С друге стране, сложенији модели су неопходни кад се жели да се о биопроцесу сазна више и детаљније, било унутар (интерполација) било ван (екстраполација) граница експерименталних испитивања. Интерполација је посебно значајна за техноекономску анализу биопроцеса (уштеде времена, радне снаге или скувих сировина и сл.), док су разлози за екстраполацију сувише дуго трајање процеса, недостатак аналитичке опреме, немогућност мерења ниских концентрација супстрата или производа и сл.

Симулација тока биопроцеса тестирањем вредности параметара модела омогућава боље разумевање и објашњавање резултата биопроцеса. Модели који се користе у ове сврхе представљају "право" моделовање у стриктном значењу, јер они служе да потврде (или оповргну) хипотезу о механизму биопроцеса и на тај начин објасне његову природу (Барас и сар., 2009).

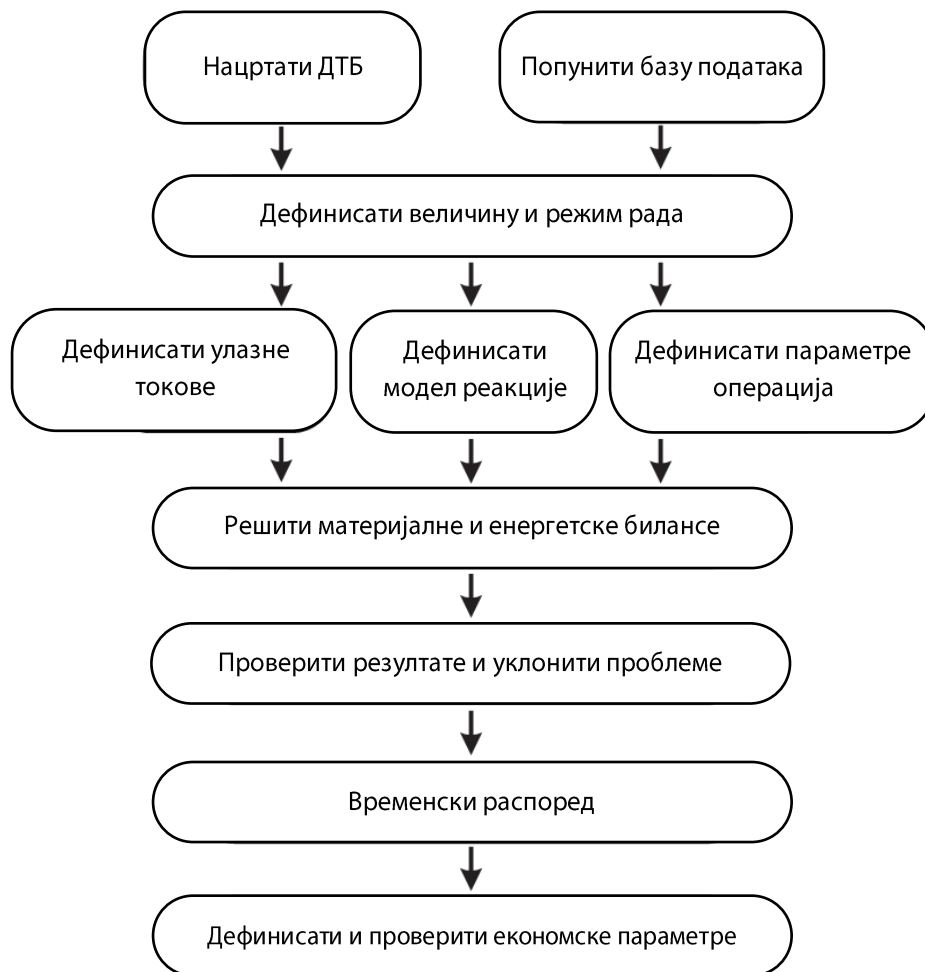
СОФТВЕР ЗА СИМУЛАЦИЈУ БИОПРОЦЕСА

Софтвер за симулацију биопроцеса је серија компјутерских алгоритама способних за математичко моделовање учинка индивидуалних оперативних јединица, чија основна предност јесте што се сви аспекти управљања процеса налазе на једном месту и могу се истовремено испитивати (Shanklin et al., 2001). Симулације омогућавају предвиђање различитих сценарија који се могу јавити током рада постројења, док приликом пројектовања биопроцеса и његовог превођења у индустријске размере, симулација може да замени експерименте, како би се проширила основа за доношење одлука (Sokolowski and Banks, 2009).

Постоји више софтвера који се примењују за симулацију биопроцеса, а један од њих јесте SuperPro Designer™ (Intelligen, Inc. САД). Редослед узастопних корака при симулацији биопроцеса приказан је на слици 3.3.

Први корак представља формирање дијаграма тока биопроцеса на радној површини симулатора. Симулатор садржи моделе за већину процедура и опреме која се уобичајено користи у биотехнолошким процесима. Иконе које означавају опрему се спуштају на радну површину по редоследу који заузимају у биопроцесу. Дијаграм тока биопроцеса се комплетира помоћу улазних токова, токова који повезују уређаје и излазних токова, који прелазе границу симулационог модела.

Дефинисањем различитих секција биопроцеса (нпр. припрема, биореакција и биосепарација) олакшана је анализа резултата симулације и омогућено подешавање различитих вредности параметара општег модела у различитим секцијама.



Слика 3.3. Кораци при дефинисању модела у софтверу за симулацију биопроцеса

Пре почетка детаљног моделовања појединачних јединица мора се саставити база података биопроцеса. Ова база података садржи све материјале који улазе у биопроцес или настају током биопроцеса. Најчешће, софтвер има базу података која садржи уобичајено употребљавана једињења, док се остали материјали морају дефинисати. База података може да садржи материјале дефинисане са великим бројем особина, а како би се убрзао процес дефинисања нових материјала, најчешће се у базу података уносе само оне вредности које су од значаја за биопроцес.

У следећем кораку дефинише се дијаграм тока биопроцеса и све укључене операције. Пре спецификације улазних токова и јединица модела, мора се одредити величина биопроцеса, што се постиже дефинисањем потребне запремине биореактора. При спецификацији јединица модела, препоручује се да се направи копија дијаграма тока биопроцеса и започне нови са истом базом података материјала. Овде се прва процедура и њени токови цртају и спецификују и овај део модела се испитује све док се не исправе све грешке. Након тога се додаје следећи процесни корак и спецификује.

За сваки корак морају се дефинисати токови који улазе у биопроцес, а затим се подешава састав сваког појединачног тока. Затим се укупна маса или запремина тока дефинише директно у спецификацијама тока.

Дефинисањем величине тока, одређује се величина опреме са којим је повезан, нпр. суд за мешање. Алернативно, укупна маса односно запремина остаје променљива, а параметри модела пријемне опреме захтевају улазну количину. На пример, суд за мешање дефинисане величине пуни се до одређене запремине.

Већина процедура састоји се од неколико узастопних корака. За суд са мешањем типичан редослед корака односно операција је: увођење воде и осталих компонената, мешање садржаја суда и извођење садржаја из суда. Прво је неопходно дефинисати редослед операција, а потом се параметри модела једне операције морају дефинисати.

Симулатор биопроцеса укључује унапред дефинисане моделе за већину операција биопроцеса тако да се само параметри модела морају дефинисати. Модел процедуре је обично објашњен у документима за помоћ. Вредности параметара се узимају из прикупљених података о биопроцесу или из корисниковог инжењерског знања. Софтвер обично пружа уобичајене вредности, које представљају средње вредности за процедуре и стога су значајни односно представљају велику помоћ у раним фазама пројектовања. За основне елементе, ове вредности могу да се претпоставе. Међутим, оне могу значајно варирати од ситуације до ситуације и управо зато се, у детаљно описаном моделу, препоручује што мања употреба уобичајених вредности.

Број неопходних параметара зависи од сложености операције. За једноставан процесни корак, попут увођења сировине у биореактор, довољно је дефинисати улазни ток, време почетка и брзину пуњења. У биореакционом кораку, једна или више реакционих једначина се дефинише на бази масе или молова, како би се описао нестанак реактаната и настанак главног производа и споредних производа.

У великом броју случајева биопроцес укључује неколико идентичних делова опреме, на пример неколико биореактора који раде у раскораку. Како би се сваки корак моделовања олакшао, препоручује се да се прво моделује биопроцес са само једним комадом опреме. Када овакав модел даје задовољавајуће резултате, он се може проширити.

Ефикасан временски распоред је неопходан за оптималну производњу и економски прихватљив биопроцес. Међутим, у процесу моделовања, препоручује се – да се не обраћа превише пажње на временски распоред, све док свака операција у дисконтинуалном поступку не представља појединачну радну јединицу. Тек тада модел треба проширити на жељени број биореактора или сепарационих јединица (нпр. хроматографске колоне).

Поред сировина, биопроцес захтева комуналне услуге, потрошне материјале и радну снагу. Различите врсте комуналних услуга и потрошних материјала су унапред дефинисане у програму. Након прикладног рада основног модела, ове дефиниције треба проверити у односу на биопроцес који се разматра. На пример, часовни трошкови за радну снагу могу бити другачији за различите локације или употребљена пара може имати другачију температуру, и стога обезбедити другачију количину топлоте од оне која је предвиђена моделом. Годишњи утрошак потрошног материјала, као што су мембране или хроматографске смоле, дефинисан је на основу количине потребне по једној шаржи, максималних радних часова и века трајања. Могући извори информација о овим параметрима могу бити експериментални подаци, добављачи или литература. Количина радне снаге је дефинисана за сваку операцију и одређује број људи по смени и број смена.

Процес моделовања је високоитеративан и у већини случајева је потребно много кориговања током подешавања реалног модела, а резултате је најчешће тешко прецизно проверити. Зато је неопходно редовно проверавати, бар веродостојност резултата, провером величина вредности токова и њихових састава, као и вредности параметара модела, прегледом извештаја након симулације. Неопходно је проверити претпоставке које се тичу комуналних услуга, потрошног материјала и радне снаге.

Када је основни модел потпун, поново је потребно неколико „покретања“ симулације, како би се одредио број биореактора и оптимизовао временски распоред. Крајњи технички модел резултује материјалним и енергетским билансом биопроцеса.

Након провере техничког модела, подешавају се економски параметри биопроцеса и модела. Програм обезбеђује основне информације о ценама и комплет алата за економску процену. Међутим, паралелно са техничким моделом, мора бити проверен и економски модел (Heinzle et al., 2006; Вучуровић и сар., 2012; Вучуровић, 2015).

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

4.1. ПРОИЗВОДНИ МИКРООРГАНИЗАМ

Као производни микроорганизам за биосинтезу ксантана у свим фазама истраживања из оквира ове дисертације, примењен је референтни сој *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 који се дуги низ година чува у збирци култура предмета Индустијска микробиологија Технолошког факултета Нови Сад. Овај сој одабран је као најбољи између више сојева који припадају истом роду, на основу резултата истраживања који нису приказани у овој дисертацији (Вајић et al., 2015c). Производни сој се чува на агаризованој подлози одговарајућег састава (квашчев малтозни агар – YM[®], Difco), на температури од 4°C уз месечно пресејавање.

4.2. ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ И КУЛТИВАЦИОНИ МЕДИЈУМИ

У зависности од специфичних циљева дефинисаних у конкретним огледима, током истраживања из оквира ове докторске дисертације, примењене су хранљиве подлоге и култивациони медијуми различитог састава.

Као основа култивационих медијума примењени су отпадни ефлуенти из 18 фабрика које припадају различитим гранама прехрамбене индустрије и то из производње и/или прераде јестивог уља, шећера, кондиторских производа (кекса и чоколаде), замрзнутог воћа и поврћа, меса, млека и киселомлечних производа, скроба, сока од јабуке и брескве, пива, вина, алкохола на меласи, из кукуруза и из скробних сировина, као и колагених омотача.

За освежавање и умножавање производног микроорганизма, односно припрему инокулума у свим фазама истраживања примењене су комерцијалне хранљиве подлоге, квашчев малтозни агар и квашчев малтозни бујон (YM[®], Difco).

Састав култивационих медијума примењених за прелиминарна испитивања (поглавље 5.1), односно за испитивање могућности примене обогаћених отпадних вода за биотехнолошку производњу ксантана је следећи [g/l]: извор угљеника до 15,00, извори укупног азота 0,20, K₂HPO₄ 2,5 и MgSO₄·7H₂O 0,50. Припрема ових медијума је подразумевала анализу отпадних вода у погледу количине извора угљеника, а потом њихово обогаћивање одговарајућим шећером до горенаведеног садржаја, при чему је за обогаћивање култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње пива коришћена малтоза, уља глукоза, млека лактоза, скроба растворљиви скроб, док су отпадне воде из производње алкохола и кондитора обогаћене одговарајућим количинама сахарозе.

Састав полусинтетичке подлоге са глукозом (поглавље 5.2.2) је формулисан у складу са потребама производног микроорганизма за раст и синтезу производа. Полусинтетичка подлога са глукозом формулисана је на следећи начин [g/l]: глукоза 15,00, извори укупног азота 0,20 и фосфора 0,045, као и MgSO₄·7H₂O 0,50.

Састав култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде из различитих грана прехранбене индустрије, а који су примењени за испитивање могућности примене ових ефлуената као основе култивационог медијума за биосинтезу ксантана (поглавље 5.2.2 и 5.3.2), је следећи [g/l]: извор угљеника до 15,00, извори укупног азота до 0,20 и фосфора до 0,045. Припрема ових медијума подразумевала је разблаживање и/или обогаћивање примењених ефлуената, на основу резултата карактеризације (табела 5.3. и табела 5.16) тако да садрже горенаведене количине одговарајућег извора угљеника, азота и фосфора.

Приликом формулисања култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља, замрзнутог поврћа, меса, млека, киселомлечних производа и колагенских омотача, као извор угљеника примењена је глукоза. Као извор угљеника приликом формулисања медијума који као основу садрже отпадну воду из производње шећера, кекса, чоколаде и алкохола на меласи коришћена је сахароза. Фруктоза је коришћена као извор угљеника приликом формулисања култивационог медијума на бази отпадне воде из производње замрзнутог воћа, сока од брескве и јабуке, док је еквимоларна смеша фруктозе и глукозе примењена за обогаћивање медијума који садржи отпадну воду из производње вина. Култивациони медијум на бази отпадне воде из производње пива је обогаћен малтозом, док су отпадне воде из производње скроба, алкохола из кукурузних и скробних сировина обогаћене растворљивим скробом.

У експериментима који су за циљ имали оптимизацију култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља (поглавље 5.2.3), састав употребљених медијума је дефинисан према одабраном експерименталном плану. Састав медијума је следећи [g/l]: као извор угљеника употребљена је глукоза у концентрацијама 10,00; 20,00 и 30,00, извори азота су додати у концентрацијама од 0,02; 0,1 и 0,2, док је извор фосфора додат у концентрацијама 0,0045; 0,025 и 0,045. Поред тога, култивациони медијуми су додатно обогаћени са 0,50 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. На култивационом медијуму оптималног састава је изведена биосинтеза ксантана у увећаним размерама (поглавље 5.2.4).

Приликом оптимизације полусинтетичке подлоге са глукозом (поглавље 5.3.3) употребљене хранљиве подлоге су имале следећи састав [g/l]: глукоза (10,00; 30,00 и 50,00), извори укупног азота (0,20; 0,1 и 0,2) и фосфора (0,0045; 0,025 и 0,045). На оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом изведена је биосинтеза ксантана у увећаним размерама, а дефинисани садржај основних нутријената је искоришћен и у експериментима биосинтезе ксантана на одабраним отпадним водама у увећаним размерама (поглавље 5.3.4).

У свим примењеним експериментима, приликом формулације хранљивих подлога и култивационих медијума, као извори азота коришћени су екстракт квасца и $(NH_4)_2SO_4$ који су додати у тако дефинисаним количинама да однос органског и неорганског азота из ове две компоненте буде 1:1, док је као извор фосфора употребљен KH_2PO_4 .

Вредност рН свих примењених подлога и култивационих медијума подешена је на $7,0 \pm 0,2$ пре стерилизације која је изведена аутоклавирањем на температури од $121\text{ }^\circ\text{C}$ и притиску од 2,2 bar у трајању од 20 min.

4.3. ПРИПРЕМА ИНОКУЛУМА

Припрема инокулума је изведена у два корака, прво освежавањем производног микроорганизма на агаризованој подлози одговарајућег састава (26°C, 24 h) а потом двоструким пасажирањем како би се добила количина која је довољна за инокулацију подлоге за биосинтезу. Инкубација сваке пасаже изведена је у течной подлози, субмерзном култивацијом са слободним ћелијама, у аеробним условима уз екстерно мешање од 150 o/min на температури од 26°C у трајању од 36 h. Све хранљиве подлоге и култивациони медијуми за биосинтезу ксантана инокулисани су са 10% (v/v) припремљеног инокулума.

4.4. УСЛОВИ БИОСИНТЕЗЕ

Биосинтеза ксантана је у свим експериментима изведена субмерзном техником, применом слободних ћелија производног микроорганизма на одговарајућим медијумима чији је састав дефинисан у поглављу 4.2.

Прелиминарни експерименти (поглавље 5.1) и експерименти који су за циљ имали испитивање биосинтезе ксантана и процену њене успешности (поглавље 5.2.2) су изведени у лабораторијском биореактору (*Woulff*-ова боца) укупне запремине 2 l (радна запремина 1,5 l) у трајању од 120 часова. Култивација је текла у аеробним условима са протоком кондиционираног ваздуха од 1 l/min уз екстерно мешање од 150 o/min у првих 48 часова, а након тога са протоком од 2 l/min уз екстерно мешање од 250 o/min. Биопроцес је у првих 48 часова извођен на температури од 26°C након чега је температура повећана на 30°C.

Оптимизациони експерименти (поглавље 5.2.3 и 5.3.3) су изведени у ерленмајерима укупне запремине 300 ml (радна запремина 100 ml) у трајању од 96 часова. Култивација је изведена на температури од 26°C уз спонтану аерацију и екстерно мешање од 150 o/min у првих 48 часова, а након тога на температури од 30°C уз спонтану аерацију и екстерно мешање од 250 o/min .

Биосинтеза ксантана на оптимизованом култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља (поглавље 5.2.4) изведена је у лабораторијском биореактору (Biostat® Aplus, Sartorius AG, , Немачка) укупне запремине 3 l (радна запремина 2 l), у трајању од 96 часова.

Експерименти изведени са циљем дефинисања кинетичких модела биосинтезе ксантана применом оптимизоване подлоге са глукозом и култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде одабраних грана прехранбене индустрије (поглавље 5.3.4), изведени су у лабораторијском биореактору (Chemar AG CH-8604, Швајцарска) укупне запремине 7 l (радне запремине 5 l), у трајању од 96 часова.

Биосинтеза ксантана у биореакторима запремине 3 l и 7 l изведена је на температури од 26°C, у аеробним условима са протоком кондиционираног ваздуха од 1 l/min уз мешање интерно постављеном Руштоновом турбином, од 150 o/min током првих 36 часова биопроцеса. Након тога, температура, аерација и мешање су повећани на вредности од 30°C, 2 l/min и 300 o/min, редоследом.

4.5. ИЗДВАЈАЊЕ ПРОИЗВОДА

Како би се одредио садржај ксантана, по завршеној биосинтези потребно је из култивационе течности издвојити синтетисани биополимер. Добијене култивационе течности су центрифугиране при 10000 о/min (Hettich Rotina 380 R, Немачка) у трајању од 30 min. У охлађени супернатант додаван је хладан 96% (v/v) етанол у малим порцијама (1 кап/s) уз непрекидно мешање (Tehtnica UM-401, Словенија) до садржаја етанола од 60% (v/v). Када је утрошена половина потребне количине алкохола додат је засићени раствор калијум-хлорида тако да његов садржај у смеси по завршетку таложења буде 1% (v/v). Током таложења температура смеше одржавана је испод 15°C. Након завршеног поступка таложења смеша је држана на 4°C током 24 часа са циљем дехидратације исталоженог ксантана. Ксантан је из смеше издвојен центрифугирањем при 3500 о/min у трајању од 15 min, а потом сушен на 60°C до постизања константне масе. Добијени резултати су употребљени за одређивање садржаја ксантана.

4.6. ЛАБОРАТОРИЈСКИ АНАЛИТИЧКИ ПОСТУПЦИ

4.6.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕФЛУЕНАТА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

За карактеризације индустријских ефлуената велики значај има правилно узорковање и припрема узорака за лабораторијска испитивања. Места на којима је вршено узимање узорака отпадних вода за потребе ових истраживања бирају се тако да ефлуенти скупљени из различитих производних погона потенцијално испуњавају биотехнолошке захтеве. За испитивање могућности примене отпадних вода прехранбене индустрије као супстрата за припрему подлога у биотехнолошкој производњи, селектовани су извори који генеришу воде са најмањом количином инхибирајућих супстанци, а које по могућству садрже и одређену количину потребних нутријената.

Избегавано је узорковање на местима у којима се генеришу воде са високим садржајем агенаса за чишћење и санитацију јер разградња наведених компоненти биотехнолошким путем може бити отежана услед инхибиране активности биокатализатора. Такође, неке од отпадних вода које су искоришћене у оквиру ових истраживања представљају збирне отпадне воде фабрике прехранбене индустрије или индустрије пића, док друге представљају отпадне воде из одређеног сегмента производње и као такве садрже различито органско оптерећење.

Ефлуенти прикупљени из различитих фаза производње из фабрика које припадају различитим гранама прехранбене индустрије и индустрије пића су анализирани у погледу параметара од значаја за карактеризацију отпадних вода, али и оних чији је значај првенствено за биотехнолошку производњу.

Вредности рН ефлуената је одређена применом мултипараметарског лабораторијског анализатора Consort C863 (Consort, Белгија), урањањем стаклене електроде директно у узорак.

Вредности хемијске потрошње кисеоника (ХПК) и биолошке потрошње кисеоника (БПК) одређене су применом стандарних метода (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998),

Одређивање садржаја укупних суспендованих честица изведено је гравиметријском методом (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998).

За одређивање редукујућих материја примењена је спектрофотометријска метода са динитросалицилном киселином (Miller, 1959). Редукујуће материје представљају индиректан показатељ садржаја редукујућих шећера и као такве се разматрају у даљем тексту. С обзиром да различити медијуми садрже различите шећере, приликом њиховог одређивања за сваки шећер је конструисана одговарајућа калибрациона права. Поред тога, са циљем одређивања садржаја редукујућих материја у медијумима који су обogaћени нередукуюћим шећерима (сахароза и лактоза) и полисахаридом (скроб) извршена је њихова киселинска или ензимска хидролиза. Хидролиза лактозе и сахарозе је изведена на следећи начин: у нормални суд од 50 ml одпипетирано је 5 ml узорка, додато 2 ml 1M HCl и постављено у кључало водено купатило (100°C) при одређивању лактозе, односно у водено купатило на 70°C при одређивању сахарозе, у трајању од 30 min. Потом је извршена неутрализација додатком 1,5 ml 1M NaOH и нормални суд допуњен до црте. У овако припремљеним узорцима одређен је укупан садржај редукујућих шећера, а на исти начин хидролизован су и стандардни раствори лактозе односно сахарозе коришћени за припрему калибрационе праве. Хидролиза скроба је изведена применом комерцијалних ензима *Alkozym Plus* и *Alkozym LHT* и у складу са упутством произвођача.

Одређивање садржаја укупног азота изведено је методом по Кјелдалу (Helrich, 1990).

Садржај асимилабилног азота у узорцима отпадних ефлуената различитих грана прехранбене индустрије одређиван је волуметријском методом (Zoecklein et al., 1999).

Садржај укупног фосфора одређиван је спектрофотометријском методом (Gales et al., 1966),

За одређивање магнезијума, калијума, калцијума и натријума примењена је атомска апсорпциона спектрофотометрија (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998),

4.6.2. АНАЛИЗА КУЛТИВАЦИОНЕ ТЕЧНОСТИ

Ток биосинтезе је праћен одређивањем различитих показатеља успешности биосинтезе ксантана, анализирањем узорака који су прикупљани у стерилним условима и тачно одређеним временским интервалима дефинисаних у складу са захтевима конкретног експеримента. У зависности од захтева аналитичке методе узорци су на одговарајући начин обрађени пре мерења. Раздвајање течне и чврсте фазе култивационе течности извршено је центрифугирањем на 10000 о/min у трајању од 10 min (Hettich Rotina 380 R, Немачка).

Садржај извора угљеника у супернатанту култивационе течности одређен је високопритисном течном хроматографијом. Припрема узорака је изведена њиховим пропуштањем кроз 0,45 µm најлонски филтер (Agilent Technologies, Немачка). Инструмент за високопритисну течну хроматографију (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 series) опремљен је са пумпом HPG-3200SD/RS, аутосамплером WPS-3000(T)SL (запремина ињектованог узорка износила је 10 µl), колоном ZORBAX NH2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) и детектором (RefractoMax520). Као мобилна фаза коришћен је 75% (v/v) ацетонитрил са протоком од 1,2 ml/min. Време елуције било је 20 min, а температура колоне 25°C.

Одређивање садржаја укупног азота у супернатанту култивационе течности изведено је методом по Кјелдалу (Helrich, 1990).

Садржај асимилабилног азота у супернатанту култивационе течности одређиван је волуметријском методом (Zoecklein et al., 1999).

Садржај укупног фосфора у супернатанту култивационе течности одређиван је спектрофотометријском методом (Gales et al., 1966),

Садржај ксантана у супернатанту култивационе течности одређен је гравиметријском методом (Додић и Граховац, 2013).

Одређивање садржаја биомасе у узорцима култивационе течности изведено центрифугирањем узорка разблажених истом запремином физиолошког раствора, при 10000 o/min (Hettich Rotina 380 R, Немачка) у трајању од 30 min. Добијени талог је испран са физиолошким раствором а потом сушен до константне масе на температури од 105°C.

Одређивање реолошких карактеристика култивационих течности ксантана изведено је применом ротационог вискозиметра са коаксијалним цилиндрима (Додић и Граховац, 2013). Добијене вредности напона смицања коришћене су за одређивање реолошких параметара, односно индекса тока и фактора конзистенције.

Привидни вискозитет култивационе течности израчунат је применом *Ostwald-de Waele*-овог модела:

$$\eta_a = 1000 \cdot K \cdot D^{n-1} \quad (4.1)$$

где је:

η_a – привидни вискозитет култивационе течности [mPa·s],

K – фактор конзистенције [Pa·sⁿ],

n – индекс тока [1] и

D –брзина смицања која има вредност 145,8 [1/s].

4.7. СТАТИСТИЧКА И МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА

Сви резултати приказани у овом раду представљају средње вредности добијене из три експеримента поновљена под истим условима.

Резултати су статистички обрађени анализом варијансе при степену значајности од 0,05, док је адекватност модела процењена на основу коефицијента детерминације (R^2) и p -вредности модела.

Приликом испитивања утицаја садржаја извора угљеника, азота и фосфора на биосинтезу ксантана коришћен је *Vox-Behnken*-ов експериментални план са три фактора на три нивоа и три понављања у централној тачки.

За опис одабраних одзива (Y_i) примењен је полином другог реда:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}^2X_1^2 + b_{22}^2X_2^2 + b_{33}^2X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (4.2)$$

где су:

- b_0 - одсецак,
- b_1, b_2 и b_3 - линеарни коефицијенти,
- b_{11}, b_{22} и b_{33} - квадратни коефицијенти и
- b_{12}, b_{13} и b_{23} - коефицијент интеракције.

а независно променљиве/фактори:

- X_1 -садржај извора угљеника [g/l],
- X_2 - садржај азота [g/l],
- X_3 - садржај фосфора [g/l],

Статистичка обрада експерименталних података и цртање површина одзива је урађено применом софтверског пакета STATISTICA 13.0 (Dell, САД). За нумеричку и графичку оптимизацију фактора примењена је метода жељене функције у софтверском пакету DESIGN-EXPERT 8.1 (StatEase Inc, САД).

4.8. КИНЕТИЧКО МОДЕЛОВАЊЕ И ПРОРАЧУН КИНЕТИЧКИХ ПАРАМЕТАРА БИОПРОЦЕСА

На основу измерених вредности садржаја биомасе, извора угљеника и производа у дефинисаним временским интервалима биопроцеса, извршен је прорачун њихових извода помоћу нумеричког диференцирања. Брзине настајања биомасе (r_x), производње ксантана (r_p) и потрошње извора угљеника (r_s) израчунате су дељењем функције „*moving average*“ (Data Analysis ToolPak, Microsoft Office Excel 2010), за вредности садржаја биомасе, ксантана и извора угљеника, редоследом, од првог до трећег узорка од три узастопна узорковања, са временским интервалом који покрива ова три узорковања. Специфична брзина раста (μ) је израчуната дељењем брзине настајања биомасе са садржајем биомасе у датом тренутку.

Коефицијент приноса ксантана представља садржај ксантана добијен по јединици утрошеног супстрата и рачунат је према следећој једначини:

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S} \cdot 100 \quad (4.3)$$

где је:

- $Y_{P/S}$ - коефицијент приноса ксантана [%],
- P_t – садржај ксантана у моменту узорковања [g/l],
- P_0 – садржај ксантана непосредно након инокулације [g/l],
- S_0 – садржај извора угљеника непосредно након инокулације [g/l] и
- S – садржај извора угљеника на крају биосинтезе ксантана [g/l].

Коефицијент приноса биомасе представља количину биомасе настале по јединици утрошеног супстрата и рачунат је према следећој једначини:

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S} \cdot 100 \quad (4.4)$$

где је:

- $Y_{X/S}$ – коефицијент приноса биомасе [g/g],
- X_t – садржај биомасе у моменту узорковања [g/l],
- X_0 – садржај биомасе непосредно након инокулације [g/l],
- S_0 – садржај извора угљеника непосредно након инокулације [g/l] и
- S – садржај извора угљеника на крају биосинтезе ксантана [g/l].

Степен конверзије извора угљеника у ксантан након биосинтезе израчунат је применом следеће једначине:

$$K_K = \frac{P}{S_0} \cdot 100 \quad (4.5)$$

где је:

- K_K – степен конверзије извора угљеника у ксантан [%],
- P – садржај ксантана на крају биосинтезе [g/l] и
- S_0 – садржај извора угљеника на почетку биосинтезе [g/l].

Степен конверзије извора угљеника након биосинтезе ксантана рачунат је применом следеће једначине:

$$K_S = \frac{S_0 - S_t}{S_0} \cdot 100 \quad (4.6)$$

где је:

- K_S – степен конверзије извора угљеника [%],
- S_0 – садржај извора угљеника на почетку биосинтезе [g/l] и
- S_t – садржај извора угљеника на крају биосинтезе [g/l].

Израчунавање степена конверзије укупног азота након биосинтезе ксантана изведено је применом следеће једначине:

$$K_N = \frac{N_{UK0} - N_{UKt}}{N_{UK0}} \cdot 100 \quad (4.7)$$

где је:

- K_N – степен конверзије азота [%],
- N_{UK0} – садржај азота на почетку биосинтезе [g/l] и
- N_{UKt} – садржај азота на крају биосинтезе [g/l].

Израчунавање степена конверзије укупног фосфора након биосинтезе ксантана изведено је применом следеће једначине:

$$K_p = \frac{P_{UK0} - P_{UKt}}{P_{UK0}} \cdot 100 \quad (4.8)$$

где је:

K_p – степен конверзије фосфора [%],

P_{UK0} – садржај фосфора на почетку биосинтезе [g/l] и

P_{UKt} – садржај фосфора на крају биосинтезе [g/l].

4.8.1. КИНЕТИЧКИ МОДЕЛ ЗА НАСТАЈАЊЕ БИОМАСЕ

За описивање раста микроорганизама примењена је логистичка једначина. Логистичка једначина представља модел који не обухвата утицај потрошње супстрата и може се применити за описивање и експоненцијалне и стационарне фазе раста, док се за описивање фазе одумирања не примењује (Вучуровић, 2015).

Логистичка једначина је добијена из *Malthus*-ове једначине која описује експоненцијални раст у дисконтинуалним условима и која се може представити следећом једначином:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (4.9)$$

док је специфична брзина раста дата изразом:

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (4.10)$$

где је:

X – садржај биомасе [g/l],

X_m – максималан садржај биомасе [g/l] и

μ_m – максимална специфична брзина раста [h^{-1}].

Комбиновањем и интеграљењем претходне две једначине добија се логистичка једначина:

$$X(t) = \frac{X_0 \cdot \exp(\mu_m \cdot t)}{1 - (X_0 / X_m) \cdot (1 - \exp(\mu_m \cdot t))} \quad (4.11)$$

где је:

X_0 – садржај биомасе непосредно након инокулације [g/l].

Логистичким моделом изведена је провера вредности X_0 , X_m и μ_m .

4.8.2. КИНЕТИЧКИ МОДЕЛ ЗА БИОСИНТЕЗУ ПРОИЗВОДА

Кинетика производње ксантана описана је *Luedeking-Piret*-овом једначином модела која је једним делом повезана са растом док другим није, а приказана је следећом једначином:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \frac{dX}{dt} + \beta \cdot X \quad (4.12)$$

где је:

- α – параметар који је везан и зависи од раста и
- β – параметар који није везан и не зависи од раста.

Горенаведени параметри су емпиријске константе које могу да варирају са култивационим условима као што су температура, вредност рН или брзина мешања (Gilani et al., 2011b).

Интеграљењем једначине (4.12), уз почетне услове $t=0$, $P=P_0$ и увођењем једначине (4.11) у једначину (4.12), добија се следећи облик једначине:

$$P(t) = P_0 + \alpha \cdot (X(t) - X_0) + \beta \cdot \left(\frac{X_m}{\mu_m} \right) \cdot \ln \left(1 - \left(\frac{X_0}{X_m} \right) \cdot (1 - \exp(\mu_m \cdot t)) \right) \quad (4.13)$$

Или након преуређивања може се добити следећи облик:

$$P(t) - P_0 - \beta \cdot \left(\frac{X_m}{\mu_m} \right) \cdot \ln \left(1 - \left(\frac{X_0}{X_m} \right) \cdot (1 - \exp(\mu_m \cdot t)) \right) = \alpha \cdot (X(t) - X_0) \quad (4.14)$$

Пошто се може сматрати да на почетку биосинтезе у култивационој течности нема произведеног ксантана, односно $P_0=0$, вредност параметра α може се израчунати као нагиб криве добијене из зависности леве стране једначине (4.14) и $(X(t)-X_0)$. С обзиром да је β параметар који није повезан са растом, односно његова вредност не зависи од фазе раста, те се стога може одредити на основу података из стационарне фазе раста, где је $dX/dt=0$, применом једначине:

$$\beta = \frac{(dP/dt)_{\text{стационарна фаза}}}{X_m} \quad (4.15)$$

4.8.3. КИНЕТИЧКИ МОДЕЛ ЗА ПОТРОШЊУ ИЗВОРА УЉЕНИКА

Кинетика потрошње супстрата, односно одговарајућег извора уљеника је описана применом модификоване *Luedeking-Piret*-ове једначине која је дата следећим изразом:

$$-\frac{dS}{dt} = \gamma \cdot \frac{dX}{dt} + \delta \cdot X \quad (4.16)$$

где је:

- γ – параметар који је везан и зависи од раста и
- δ – параметар који није везан и не зависи од раста.

Интеграљењем једначине (4.16), уз почетне услове $t=0$, $S=S_0$ и увођењем једначине (4.11) у једначину (4.16), добија се следећи облик једначине:

$$S_0 - S(t) = \gamma \cdot (X(t) - X_0) + \delta \cdot \left(\frac{X_m}{\mu_m} \right) \cdot \ln \left(1 - \left(\frac{X_0}{X_m} \right) \cdot (1 - \exp(\mu_m \cdot t)) \right) \quad (4.17)$$

Или након преуређивања може се добити следећи облик:

$$S_0 - S(t) - \delta \cdot \left(\frac{X_m}{\mu_m} \right) \cdot \ln \left(1 - \left(\frac{X_0}{X_m} \right) \cdot (1 - \exp(\mu_m \cdot t)) \right) = \gamma \cdot (X(t) - X_0) \quad (4.18)$$

Вредност параметра γ се може израчунати као нагиб криве добијене из зависности леве стране једначине (4.18) и $(X(t)-X_0)$.

С обзиром да је δ параметар који није повезан са растом, односно његова вредност не зависи од фазе раста, те се стога може одредити на основу података из стационарне фазе раста, где је $dX/dt=0$, применом једначине:

$$\delta = \frac{(dS/dt)_{\text{стационарна_фаза}}}{X_m} \quad (4.19)$$

Анализирани модели су применом комерцијално доступног софтвера SigmaPlot®11 (Systat Software Inc, САД), фитовани у експерименталне податке помоћу нелинеарне регресионе анализе уз добијање статистичког индикатора исправности регресије (R^2).

4.9. ГЕНЕРИСАЊЕ СИМУЛАЦИОНОГ МОДЕЛА БИОПРОЦЕСА

За генерисање модела биопроцеса производње ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима који као основу садрже отпадне воде различитих грана прехранбене индустрије и индустрије пића примењен је софтвер *SuperPro Designer*® v9.0 (Intelligen Inc, САД), који омогућава процену процесних и економских параметара испитиваног биопроцеса.

Економска анализа је изведена за предложени модел биопроцеса и приказана је као извештај економских индекса пројекта. Развијени модели производње ксантана као део трошкова улагања узимају у обзир само капиталне трошкове, односно радни капитал. Оперативни трошкови су израчунати сабирањем трошкова везаних за сировине и комуналије, трошкове везане за објекте (доступност опреме, одржавање, осигурање, локалне таксе, итд.), трошкове радне снаге и лабораторије, као и контроле и обезбеђења квалитета.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1. СКРИНИНГ МОГУЋНОСТИ ПРИМЕНЕ ЕФЛУЕНАТА У БИОТЕХНОЛОШКОЈ ПРОИЗВОДЊИ КСАНТАНА

Светске резерве свеже воде су ограничене и угрожене све интензивнијим загађивањем животне средине. Како би се избегао потенцијални недостатак свеже воде неопходно је непрекидно проналазити нове начине решавања проблема пречишћавања и управљања отпадним водама који су економски и еколошки ефикасни. Насупрот физичким и хемијским методама, биолошки начини обраде отпадних вода су много ефикаснији за третирање ефлуената које садрже уобичајене органске загађиваче и управо зато се биотехнолошки процеси често примењују за спречавање загађивања животне средине и обраду значајних количина генерисаних ефлуената (Anderson, 2003; Rosenwinkel et al., 2005; Buyukgungor and Gurel, 2009). Ограниченост водних ресурса намеће потребу за изналажењем могућности поновне употребе течних ефлуената различитих грана прехрамбене индустрије и индустрије пића и с обзиром на њихов састав, ови ефлуенти представљају потенцијалну сировину за биотехнолошку производњу различитих производа са тржишном вредношћу, какав је биополимер ксантан.

Карактеристика биосинтезе ксантана је неспецифичност угљенохидратног супстрата, због чега се као основа култивационог медијума могу применити различити ефлуенти за његову производњу. Потенцијалне изворе сировина за биотехнолошку производњу ксантана представљају све прехрамбене индустрије које приликом производње имају и велике количине отпадних ефлуената богатих једињењима неопходним за раст и умножавање производног микроорганизама. Међутим, да би се ови ефлуенти заиста могли употребити као основа култивационог медијума у биотехнолошкој производњи ксантана, неопходно је емпиријским путем, односно непосредном експерименталном пробом, утврдити да ли они садрже супстанце са инхибиторним утицајем на примењени производни микроорганизам (Додић, 2000; Додић и Граховац, 2013).

Прелиминарна истраживања из оквира ове докторске дисертације су обухватила скрининг могућности примене отпадних вода из неколико грана прехрамбене индустрије као основе медијума за биотехнолошку производњу ксантана (Dodić et al., 2012a; Vajić et al., 2014). С обзиром да је за неометано функционисање метаболизма производног микроорганизама и продукцију жељеног производа неопходан одговарајући састав хранљиве подлоге, односно култивационог медијума (Барас и сар., 2009; Додић и Граховац, 2013), за испитивање могућности примене отпадних ефлуената као њихове основе, култивациони медијуми су обogaћени изворима угљеника, азота, фосфора и минералних материја њиховим додатком у облику одговарајућих једињења, а у количинама дефинисаним у поглављу 4.2. Како би се проценила могућност примене отпадних вода у биотехнолошкој производњи ксантана, одређене су реолошке карактеристике култивационих течности, на основу којих се може закључити да ли је до производње биополимера, који на одговарајући начин мења реологију система, заиста и дошло, односно да ли добијене култивационе течности показују псеудопластични тип протичања, што је

карактеристика раствора ксантана (Додић и Граховац, 2013). Поред тога, у добијеним култивационим течностима је одређен садржај ксантана, као и вредности степена конверзије извора угљеника у ксантан и вредности конверзије најзначајнијих нутријената у биопроцесу производње ксантана.

Реолошке карактеристике и израчунате вредности реолошких параметара анализираних култивационих течности су приказани у табели 5.1. и указују да се применом различитих отпадних ефлуената као основе култивационог медијума добијају различите вредности привидног вискозитета (од 20,85 mPa·s до 182,23 mPa·s) и коефицијента конзистенције (од 0,1954 Pa·sⁿ до 7,1274 Pa·sⁿ). С обзиром да на вредност реолошких карактеристика утиче концентрација и структура синтетисаног макромолекула (Garcia-Ochoa et al., 2000a; Ahmed and Ramaswamy, 2004), на основу добијених резултата може се закључити да су применом различитих отпадних вода као основе обогаћеног медијума добијене различите концентрације ксантана различитог квалитета. Такође, вредности индекса тока, које су мање од јединице, указују на псевдопластични карактер добијених култивационих течности, што је несумњива потврда биосинтезе ксантана. На основу вредности реолошких параметара култивационих течности добијених након биосинтезе применом отпадне воде из производње млека које су обогаћене лактозом, може се закључити да у примењеним условима није дошло до биосинтезе.

Табела 5.1. Реологија култивационих медијума након биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије

Обогаћени култивациони медијум који као основу садржи отпадну воду из производње:	K [Pa·sⁿ]	n [1]	η_a [mPa·s]
пива	0,8358	0,4967	68,09
уља	7,1274	0,2641	182,23
алкохола	2,7847	0,3735	122,80
млека	0,0000	0,0000	0,00
скроба	0,1954	0,5509	20,85
кондитора (збирна)	1,5373	0,334	55,68
кондитора (процесна 1)	1,9763	0,2958	59,17
кондитора (процесна 2)	0,9328	0,3844	43,43
кондитора (процесна 3)	5,4696	0,2070	105,22
кондитора (процесна 4)	1,4572	0,3504	57,27
кондитора (процесна 5)	3,2609	0,2660	84,17

Вредности показатеља успешности биосинтезе ксантана, приказани у табели 5.2. указују да је све примењене отпадне воде, осим отпадне воде из производње млека, у примењеним експерименталним условима, могуће употребити као основу култивационог медијума у биотехнолошкој производњи ксантана. Веома високе вредности садржаја ксантана су добијене применом отпадне воде из производње пива (15,56 g/l), уља (14,18 g/l) и применом збирне воде из кондиторске индустрије (10,92 g/l), док су нешто ниже вредности добијене применом осталих испитаних отпадних вода као основе култивационог медијума. Такође, применом отпадних вода из различитих делова процеса различитих фабрика кондиторске индустрије, добијају се веома различите вредности садржаја ксантана, које се крећу у опсегу од 4,28-10,03 g/l, чиме је потврђено да је за биотехнолошку производњу ксантана могуће применити отпадне воде из различитих делова једног технолошког процеса.

Степен конверзије извора угљеника у ксантана применом отпадне воде из производње јестивог уља износи 104,04%, на основу чега се може закључити да је примењени производни микроорганизам поред понуђеног извора угљеника, усвајао још неки састојак који је био присутан у отпадној води, а није био детектован приликом иницијалне анализе отпадне воде као редукујућа материја. Поред тога високе вредности конверзије извора угљеника у ксантан су добијене и применом отпадне воде из производње пива као основе култивационог медијума (97,43%), али и применом осталих отпадних вода и добијене вредности се крећу у опсегу између 66,21-83,55%. Једини изузетак су отпадне воде из производње скроба и отпадна вода из кондиторске индустрије (означена као процесна 5) код којих су добијене нешто ниже вредности од 41,98% и 54,67%, редоследом.

Табела 5.2. Показатељи успешности скрининга биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије

Култивациони медијум чија је основа отпадна вода из производње:	P [g/l]	K _K [%]	K _C [%]	K _N [%]	K _P [%]
пива	15,56	97,43	86,98	23,15	22,46
уља	14,18	104,04	97,36	26,52	36,12
алкохола	8,27	66,21	98,72	18,41	21,41
млека	0,00	0,00	5,81	2,25	1,13
скроба	5,78	41,98	71,17	16,23	26,41
кондитора (збирна)	10,92	76,42	95,24	21,21	22,32
кондитора (процесна 1)	10,03	79,87	66,85	85,71	31,16
кондитора (процесна 2)	9,43	83,55	60,84	50,00	42,88
кондитора (процесна 3)	7,74	76,20	51,60	87,50	22,51
кондитора (процесна 4)	9,60	79,81	61,94	60,00	15,41
кондитора (процесна 5)	4,28	54,67	28,59	59,52	23,40

Приликом биосинтезе ксантана, у примењеним експерименталним условима дошло је до конверзије између 51,60% и 98,72% угљеника, уз изузетак вредности од 28,59% добијене применом отпадне воде из кондиторске индустрије (која је означена као процесна 5). Резултати конверзије азота након биосинтезе показују да су применом отпадне воде из производње пива, уља, алкохола, скроба и кондитора као основе медијума добијене ниске вредности конверзије азота, које износе 16,23-26,52%, док су применом отпадних вода из различитих делова процеса производње кондиторских производа добијене нешто веће вредности (50,00-87,50%). Добијени резултати степена конверзије фосфора показују да ни у једном анализираном случају, односно применом било које од отпадних вода као основе култивационог медијума, није дошло до конверзије више од 50% фосфора. Конкретно, највећа вредност конверзије фосфора је остварена применом отпадне воде из кондиторске индустрије (која је означена као процесна 2), док се применом осталих отпадних вода њена вредност креће у опсегу 15,41-36,12%.

Показатељи успешности производње ксантана применом отпадне воде из производње млека као основе медијума су потврдили резултате реолошких одређивања према којима до биосинтеза ксантана у примењеним експерименталним условима и применом соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, није ни дошло. Веома ниске вредности конверзије угљеника (5,81%), азота (2,25%) и фосфора (3,13%) показују да је производни микроорганизам показао одређену метаболичку активност међутим не у правцу синтезе жељеног производа.

На основу резултата вредности конверзије азота и фосфора може се закључити да је искоришћење ових састојака подлоге мало и да у култивационим медијумима заостају значајне количине ових нутријената. Нутријенти који заостају у култивационој течности представљају губитке са економског аспекта, али такође отежавају издвајање и пречишћавање готовог производа. Поред тога, отпадни токови који садрже оваква једињења загађују животну средину и морају се додатно пречишћавати пре испуштања у природне реципијенте што поскупљује цео процес производње жељеног производа. Управо зато, од непроцењивог је значаја правилно формулисање хранљиве подлоге у погледу најзначајнијих нутријената, извора угљеника, азота и фосфора.

Као резултат свеобухватних разматрања и резултата добијених након прелиминарних истраживања, из читавог низа отпадних ефлуената који потичу из различитих грана прехранбене индустрије, отпадне воде које потичу из производње јестивог уља су одабране као потенцијалне сировине односно основа култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана. Иако је применом отпадне воде из производње уља добијена нижа вредност садржаја ксантана у односу на садржај добијен применом отпадне воде из производње пива као основе култивационог медијума, ова отпадна вода је одабрана за даље испитивање процеса производње ксантана првенствено због изразито високе вредности степана конверзије угљеника у ксантан, којом је показано да је ова отпадна вода веома повољан супстрат за биотехнолошку производњу жељеног биополимера одабраним сојем производног микроорганизма *Xanthomonas campestris* ATCC 13951.

Поред тога, у уљарама се јављају киселе, алкалне и кондензационе отпадне воде које настају приликом испирања масти и уља, а претежно од загађујућих супстанци садрже масне киселине (Гаћеша, 1980). Обзиром да у литератури нема података да на метаболизам бектерије *Xanthomonas campestris* негативно утиче присуство масних киселина, ове отпадне воде се могу применити као основа култивационог медијума у биотехнолошкој производњи ксантана. У индустрији производње јестивог уља генеришу се велике количине отпадних ефлуената, нарочито у поступцима дегумирања, деацидификације, деодоризације и неутрализације (Aslan et al., 2009). Такође, ове отпадне воде представљају сировину која је доступна у току целе године на релативно малом простору каква је територија АП Војводине, значајни су капацитети производње јестивог уља па самим тим и количине генерисаних отпадних вода и нису познате њихове алтернативне примене као сировине за добијање производа са тржишном вредношћу.

Резултати добијени након прелиминарних истраживања су дали основу за планирање даљих експеримената из обима ове докторске дисертације. На првом месту, с обзиром на високе вредности нутријената које заостају након биосинтезе у култивационим медијумима, јавила се потреба за претходном анализом одабране отпадне воде. На основу резултата анализе отпадне воде, у погледу параметара који су од значаја преваходно за биотехнолошку производњу, култивациони медијуми који као основу садрже ове ефлуенте се могу формулисати тако да садрже неопходне нутријенте у одговарајућој количини чиме се може спречити непотребно оптерећивање медијума за одабрани биопроцес. Поред тога, са циљем формулисања одговарајућег састава медијума за биотехнолошку производњу ксантана, изведен је свеобухватан преглед доступне научне и стручне литературе и дефинисане су потребне количине извора угљеника, азота и фосфора (Rosalam and England, 2006; Zhang and Chen, 2010; Palaniraj and Jayaraman, 2011; Додић и Граховац, 2013), наведене у поглављу 4.2.

5.2. ИСПИТИВАЊЕ БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА ЕФЛУЕНТИМА ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА

На основу резултата добијених извођењем прелиминарних експеримената и свеобухватног прегледа доступне научне и стручне литературе, дефинисан је даљи ток истраживања. У следећој фази приказани су резултати анализе карактеристика отпадне воде из производње јестивог уља, која је примењена као основа култивационог медијума, а које су од значаја за биотехнолошку производњу. Даље је испитан ток биосинтезе ксанта на култивационом медијуму који као основу садржи овај ефлуент. Истовремено и при истим експерименталним условима изведена је биосинтеза ксанта на полусинтетичкој хранљивој подлози са глукозом као извором угљеника каква се уобичајено користи у производњи, са циљем утврђивања успешности примене ефлуента као сировине за производњу овог тржишно вредног биополимера. Следећа фаза истраживања је обухватила примену методе жељене функције за оптимизацију састава култивационог медијума који као основу садржи горенаведени ефлуент, у погледу садржаја најзначајнијих нутријената, извора угљеника, азота и фосфора, како би се добио максималан садржај жељеног производа, задовољавајућег квалитета уз заостајање минималних количина нутријената. Потом је изведена провера применљивости добијених оптималних вредности одабраних параметара у увећаним размерама, као и утврђивање кинетике раста биомасе, кинетике потрошње извора угљеника и кинетике настајања ксанта на отпадној води из производње јестивог уља као основе култивационог медијума. Поред тога, изведено је кинетичко моделовање биосинтезе ксанта на полусинтетичкој подлози са глукозом. Добијени кинетички модели су употребљени за симулацију изабраног биопроцеса на оба испитана култивациона медијума, применом одговарајућег софтвера и то у сегменту самог биопроцеса, односно у делу постројења у коме се дешава биореакција.

5.2.1. АНАЛИЗА ЕФЛУЕНАТА ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА

Отпадне воде прехранбене индустрије најчешће се анализирају у погледу параметара којима се уобичајено карактеришу индустријски ефлуенти, а који су прописани у складу са важећом легислативом. У великом броју случајева ови подаци нису доступни, али и када јесу, они нису довољни за процену могућности њихове разградње применом неког од биолошких третмана. Уколико би се поред биоразградње загађујућих материја одабрани ефлуенти користили и као сировине за производњу различитих метаболита, првенствено је потребно знати које изворе угљеника и/или других нутријената и у којим концентрацијама садрже. Узимајући у обзир наведене чињенице, отпадна вода из производње јестивог уља примењена у оквиру ових истраживања је анализирана и у табели 5.3. приказани су показатељи квалитета отпадних вода (вредности рН, хемијске и биолошке потрошње кисеоника и садржаја суспендованих материја) и показатељи значајни за биотехнолошку производњу (садржај редукујућих материја, укупног и асимилабилног азота, укупног фосфора и садржаја минералних материја).

Уколико се упореде вредности рН, хемијске и биолошке потрошње кисеоника, садржаја суспендованих и редукујућих материја, као и укупног и асимилабилног азота и укупног фосфора које су добијене анализом примењеног ефлуента (табела 5.3) и вредности истих показатеља квалитета доступних у литератури, а приказаних у табели 3.2, може се видети да међу њима постоје евидентне разлике. Ове разлике су и очекиване с обзиром да се квалитет и карактеристике отпадних вода значајно разликују између различитих фабрика које производе

јестиво уље (Azbar and Yonar, 2004). Добијени резултати показују да се вредност рН анализираног ефлуента налази у благо киселом подручју, што донекле коинцидира са литературно доступним подацима који наводе да вредност рН ових отпадних ефлуената може да има изразито киселу вредност (1,9) или пак да се налази у благо киселом или неутралном опсегу (6,3-7,2). Иако доступни подаци указују да су отпадне воде из производње јестивог уља ефлуенти са релативно великим органским оптерећењем услед чега је вредност ХПК висока (13750-29120 mg/l), а вредност БПК има вредност око 4500 mg/l, вредности добијене анализом конкретне отпадне воде су нешто ниже и износе 7240 и 3200 mg/l, редоследом. Такође, вредности добијене анализом садржаја суспендованих материја (3212 mg/l) су ниже од вредности из литературе, а које износе 7600 mg/l (Azbar and Yonar, 2004; Pandey et al., 2003).

Табела 5.3. Карактеристике отпадне воде из производње јестивог уља

Параметар	вредност	Параметар	вредност
рН [1]	6,2	P _{ук} [mg/l]	3,7
ХПК [mg/l]	7240	Калцијум [mg/l]	23
БПК ₅ [mg/l]	3200	Натријум [mg/l]	8,4
Редукујуће материје [mg/l]	0,23	Магнезијум [mg/l]	35
N _{ук} [mg/l]	18	Калијум [mg/l]	32
N _{асим} [mg/l]	2,4	ТСС [mg/l]	3212

На основу садржаја редукујућих материја, укупног азота и фосфора у анализираној отпадној води, може се закључити да како би се она применила као основа култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана приликом његове формулације неопходно је додати адекватне количине одговарајућих извора угљеника, азота и фосфора, како би се постигле концентрације дефинисане у поглављу 4.2.

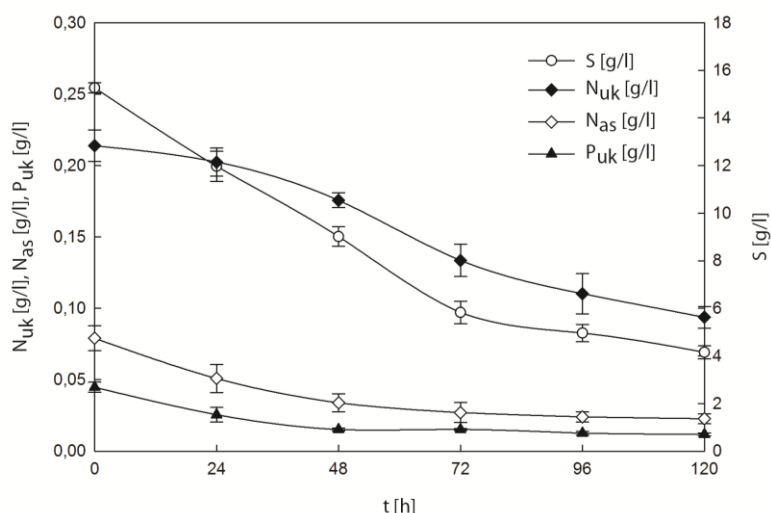
Одређивање садржаја минералних материја у ефлуенту који се примењује као основа медијума за биотехнолошку производњу ксантана има велики значај с обзиром да су ови нутријенти неопходни за неометано функционисање метаболизма производног микроорганизама (Барас и сар., 2009; Додић и Граховац, 2013). Према подацима доступним у научној литератури концентрација магнезијума која је оптимална за биосинтезу ксантана износи око 20 mg/l (Tait et al., 1986; De Vuyst et al., 1987), а на основу добијених резултата може се закључити да се у анализираној отпадној води налази довољна количина овог нутријента за поменути биопроцес. Важно је напоменути да утицај садржаја минералних материја као што су калцијум, натријум и калијум, у поређењу са утицајем других састојака медијума (угљеника, азота, фосфора или магнезијума) на биосинтезу ксантана није у потпуности познат. Међутим, ови елементи се у облику одговарајућих соли додају у хранљиве подлоге односно култивационе медијуме за производњу ксантана или се њихово присуство обезбеђује чесменском водом или додатком неког комплексног супстрата, најчешће извора азота (García-Ochoa et al., 1992; Lo et al., 1997). Уобичајено је да се у синтетичке подлоге минералне материје додају у вишку како основни метаболизам производног микроорганизама не би био угрожен. Управо из ових разлога неопходно је испитати могућност примене ефлуента из производње уља као основе медијума за производњу ксантана уз претпоставку да су присутне количине минералних материја довољне за биосинтезу услед чега овако формулисани култивациони медијум није потребно обогаћивати додатним количинама минералних соли. Поред тога, од великог значаја је испитивање могућности примене овог ефлуента као замене за процесну воду, односно утврђивање присуства или одсуства одређених супстанци које имају инхибиторно дејство на примењени производни микроорганизам, а што се заиста може утврдити једино експерименталним путем.

5.2.2. ИСПИТИВАЊЕ МОГУЋНОСТИ И ПРОЦЕНА УСПЕШНОСТИ БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНОМ МЕДИЈУМУ СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА

Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадној води из производње јестивог уља као основе култивационог медијума, изведено је како би се добио бољи увид у могућност његове примене у наведеном биотехнолошком процесу. Истовремено и при истим експерименталним условима изведена је и биосинтеза ксантана на полусинтетичкој хранљивој подлози са глукозом као извором угљеника, при чему су добијене вредности показатеља успешности биопроцеса (садржај ксантана, реолошки параметри култивационих течности, вредност конверзије извора угљеника у ксантан и конверзије најзначајнијих нутријената за биосинтезу, односно конверзије извора угљеника, азота и фосфора) примењене за поређење и процену могућности искоришћења горенаведеног ефлуента као основе култивационог медијума у биотехнолошкој производњи ксантана.

На слици 5.1. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља, док је на слици 5.2. приказана промена садржаја ових нутријената током 120 часова биосинтезе на полусинтетичкој хранљивој подлози са глукозом.

Резултати приказани на слици 5.1. показују да је промена садржаја глукозе, као извора угљеника веома интензивна током првих 72 часа биосинтезе, при чему се уочава смањење са вредности од око 15,26 g/l на вредност од око 5,83 g/l. Након 72-ог часа, утршак овог нутријента је и даље евидентан али уз мањи интензитет, до крајње концентрације од око 4,15 g/l. Садржај укупног азота се такође смањује током процеса производње ксантана. Током првих 24 часа утрошено је

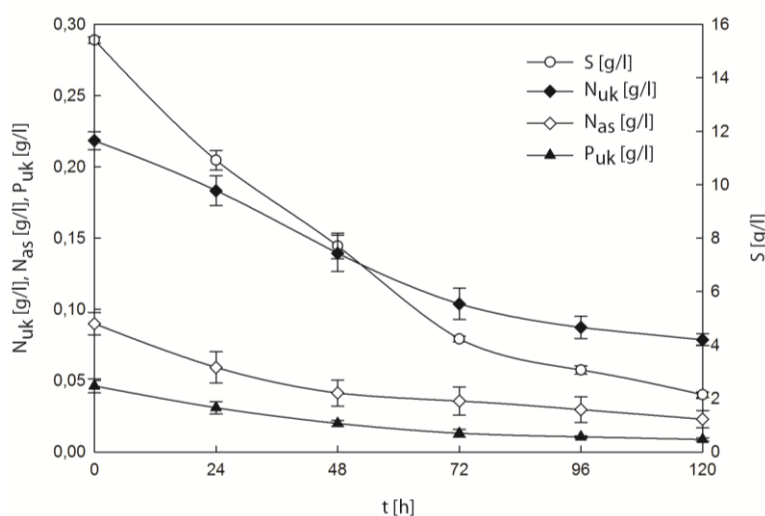


Слика 5.1. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

свега око 0,01 g/l азота, након чега се његова потрошња у одређеној мери интензивира до 72-ог часа када достиже вредност од око 0,134 g/l. Уз константно смањење током процеса, садржај укупног азота у 120-ом часу биосинтезе износи око 0,094 g/l. Садржај асимилабилног, односно амонијачног и α -амино азота се веома интензивно смањује током првих 48 часова, са вредности од око 0,079 g/l до 0,034 g/l, након чега његова вредност веома благо али ипак константно опада до 0,023 g/l на крају биопроцеса.

Веома сличан тренд показује и промена садржаја укупног фосфора. Током првих 48 часова биосинтезе његова вредност се мења са вредности од око 0,045 g/l до вредности од око 0,015 g/l, док садржај на крају биопроцеса износи 0,012 g/l.

На слици 5.2. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом. На почетку биосинтезе ксантана, непосредно након инокулације производним микроорганизмом, садржај глукозе у култивационом медијуму износи око 15,41 g/l. Током првих 72 часа биосинтезе може се уочити да је промена садржаја глукозе веома интензивна и достиже вредност од око 4,23 g/l. Након 72-ог часа, до краја биосинтезе смањење ове вредности је веома благо и у 120-ом часу износи око 2,14 g/l. Добијени резултати показују да промена садржаја извора угљеника, применом и полусинтетичке подлоге и култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду показује сличну промену, веома интензивну у прва 72 часа биосинтезе, а потом смањеног интензитета али ипак приметну до краја биосинтезе. Такође, садржај укупног азота се интензивно смањује са вредности од око 0,218 g/l до вредности од око



Слика 5.2. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

0,104 g/l у 72-ом часу биосинтезе, док у 120-ом часу достиже вредност од око 0,079 g/l. Садржај асимилабилног азота се смањује током свих 120 часова биосинтезе. У првих 48 часова та промена је више изражена и износи око 0,05 g/l док је након тога изражена у мањој мери и износи око 0,02 g/l. Садржај укупног фосфора се, такође, константно смањује током производње ксантана на полусинтетичкој хранљивој подлози, са вредности од око 0,046 g/l до 0,009 g/l колико износи на крају биосинтезе.

У табели 5.4. приказане су вредности реолошких параметара и привидни вискозитет култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља током биосинтезе ксантана и полусинтетичке хранљиве подлоге са глукозом.

Табела 5.4. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње уља и полусинтетичке подлоге са глукозом током биосинтезе ксантана

t [h]	отпадна вода из производње уља			полусинтетичка подлога са глукозом		
	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1064	0,5314	10,30 ± 0,25	0,0651	0,6386	10,91±2,63
72	0,2377	0,5120	20,90 ± 0,78	0,3245	0,4850	24,93±0,23
96	0,3392	0,4847	26,03 ± 1,36	1,2439	0,3897	59,47±1,00
120	0,4756	0,4661	33,27 ± 2,24	2,1440	0,3454	82,18±0,53

Реолошке карактеристике култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља и израчунати реолошки параметри приказани у табели 5.4. указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 10,30 mPa·s на вредност од 33,27 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,1064 Pa·sⁿ на вредност 0,4759 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање садржаја жељеног биополимера који мења реологију система. Такође, вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,5314 на вредност 0,4661), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности што је несумњива потврда биосинтезе ксантана (García-Ochoa et al., 2000a). Поред тога, резултати реолошких параметара култивационих течности добијених током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 10,91 mPa·s на вредност од 82,18 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,0651 Pa·sⁿ на вредност 2,1440 Pa·sⁿ), као и очекиване вредности индекса тока (са вредности 0,6386 на вредност 0,3454), што све указује на синтезу жељеног производа током биопроцеса. Такође, добијени резултати показују да је већа количина ксантана бољег квалитета добијена применом полусинтетичке подлоге са глукозом.

Показатељи успешности биосинтезе ксантана, односно садржај синтетисаног ксантана, степен конверзије извора угљеника у ксантан, као и конверзије извора угљеника, азота и фосфора, на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља и на полусинтетичкој подлози са глукозом приказани су у табели 5.5.

Табела 5.5. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља и на полусинтетичкој подлози са глукозом

	P [g/l]	K_K [%]	K_C [%]	K_N [%]	K_P [%]
отпадна вода из производње уља	9,98 ± 0,35	65,35 ± 1,49	72,80 ± 1,36	56,20 ± 2,06	73,79 ± 1,30
полусинтетичка подлога са глукозом	13,20 ± 0,13	86,64 ± 0,52	86,11 ± 0,69	63,99 ± 0,88	81,32 ± 1,44

Добијени резултати показују да садржај ксантана произведен на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду износи 9,98 g/l, док вредност количине ксантана на полусинтетичкој подлози износи 13,20 g/l. Такође, вредности конверзије извора угљеника у ксантан су веће за биосинтезу на полусинтетичкој подлози у односу на култивациони медијум са отпадном водом и износе око 87% и 65%, редоследом. Вредности конверзије извора угљеника, азота и фосфора, након биосинтезе ксантана имају веће вредности у биопроцесу на синтетичкој хранљивој подлози у односу на биопроцес на култивационом медијуму који садржи ефлуент из производње уља.

На основу свих приказаних резултата може се закључити да иако је биосинтеза ксантана успешнија применом полусинтетичке хранљиве подлоге, отпадна вода из производње јестивог уља представља потенцијалну сировину за производњу ксантана с обзиром да не садржи супстанце које инхибирају његову биосинтезу. Управо из ових разлога, а са циљем побољшања успешности биосинтезе ксантана, настављена су истраживања и изведена је оптимизација састава култивационог медијума на бази отпадне воде из производње јестивог уља у погледу нутријената од значаја за биосинтезу.

5.2.3. ОПТИМИЗАЦИЈА САСТАВА КУЛТИВАЦИОНОГ МЕДИЈУМА СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА

Дефинисање одговарајућег састава хранљиве подлоге представља један од критичних фактора за раст производног микроорганизама и продукцију жељеног производа, ксантана (Додић и Граховац, 2013). Оптималан састав култивационог медијума, чија је основа отпадна вода из производње јестивог уља, ће допринети неометаном метаболизму производног микроорганизама и у складу са тим, остваривању већег приноса и бољег квалитета добијеног биополимера (Вајић et al., 2016a). У самој оптимизацији биопроцеса велики значај има примена методологије одзивне површине, технике која је базирана на основним принципима статистике и за циљ има планирање експеримента, дефинисање емпиријских модела и процену утицаја независних променљивих на посматрани одзив (Esfahanian et al., 2013). До сада, ова методологија је примењена како за оптимизацију састава хранљиве подлоге, тако и за оптимизацију других параметара производње различитих биополимера, као што су ксантан, курдлан, гелан, пуллан, декстран и др. (Rafiqha et al., 2014).

Утицаји концентрација извора угљеника (S), азота (N_{uk}) и фосфора (P_{uk}) су одабрани као независне променљиве односно фактори за опис одзивних функција садржаја ксантана, P [g/l], привидног вискозитета култивационих течности, η_a [mPa·s] и резидуалних концентрација угљеника, rS [g/l], азота, rN_{uk} [g/l] и фосфора, rP_{uk} [g/l], зато што представљају макронутријенте који су есенцијални за биосинтезу ксантана и раст производног микроорганизама. Успешност изведене биосинтезе је процењена на основу садржаја насталог ксантана и привидног вискозитета добијених култивационих течности, док концентрације заосталих нутријената представљају показатеље еколошке и економске ефикасности процеса. Вариране вредности независних променљивих, у складу са примењеним *Box-Behnken*-овим експерименталним планом и вредности добијених одзива су приказане у табели 5.6.

Табела 5.6. Вредности независних променљивих и одзива након биосинтезе ксантана на култивационог медијуму са отпадном водом из производње уља

независне променљиве			одзиви					K_k [%]
X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	
S [g/l]	N_{uk} [g/l]	P_{uk} [g/l]	P [g/l]	η_a [mPa·s]	rS [g/l]	rN_{uk} [g/l]	rP_{uk} [g/l]	
10,00	0,02	0,025	8,26	34,41	0,852	0,007	0,009	82,59
30,00	0,02	0,025	15,25	64,04	14,060	0,009	0,011	50,83
10,00	0,20	0,025	8,81	25,18	0,775	0,011	0,008	88,14
30,00	0,20	0,025	16,17	65,87	15,865	0,017	0,010	53,90
10,00	0,11	0,0045	8,19	29,12	0,801	0,014	0,001	81,88
30,00	0,11	0,0045	15,63	64,20	14,962	0,014	0,002	52,10
10,00	0,11	0,045	9,51	23,87	0,870	0,008	0,015	95,10
30,00	0,11	0,045	14,94	59,92	15,865	0,013	0,017	49,80
20,00	0,02	0,0045	14,81	46,77	6,514	0,014	0,002	74,07
20,00	0,20	0,0045	11,08	49,22	7,030	0,025	0,002	55,39
20,00	0,02	0,045	12,33	48,16	6,901	0,008	0,015	61,63
20,00	0,20	0,045	13,12	41,34	6,385	0,022	0,014	65,59
20,00	0,11	0,025	13,93	43,00	8,314	0,010	0,010	69,66
20,00	0,11	0,025	14,59	42,56	8,903	0,009	0,011	72,97
20,00	0,11	0,025	14,85	42,65	9,124	0,010	0,011	74,23

Добијене вредности садржаја ксантана се налазе у опсегу од 8,19 до 16,17 g/l и највеће вредности су добијене са почетном концентрацијом извора угљеника од 30,00 g/l. Применом највеће испитане концентрације глукозе, остварен степен конверзије у ксантан је најнижи и има вредности између 49,80 и 53,90%, што је према доступним литературним подацима (Rosalam and England, 2006) у очекиваном опсегу између 50,00 и 85,00%. Применом 10,00 g/l извора угљеника остварен је степен конверзије у ксантан између 81,88-95,10%, док је са 20,00 g/l добијена нижа вредност (54,38-68,85%). Без обзира на додатну количину извора угљеника у примењеним експерименталним условима максималан садржај добијеног ксантана износи око 15,00 g/l. Очигледно је да овај садржај ксантана мења реологију култивационог медијума до те мере да отежава пренос масе кисеоника и самим тим успорава или зауставља метаболизам производног микроорганизма, а последично и биосинтезу ксантана (Garcia-Ochoa et al., 20006).

Табела 5.7. Реолошки параметри култивационих течности након биосинтезе ксантана на медијуму са отпадном водом из производње уља

број експеримента	K [Pa·s ⁿ]	n [1]
1	0,4007	0,5073
2	0,6746	0,5274
3	0,2710	0,5231
4	0,8452	0,4878
5	0,2718	0,5517
6	0,7811	0,4985
7	0,2008	0,5725
8	0,6510	0,5212
9	0,5770	0,4957
10	0,5554	0,5136
11	0,6070	0,4914
12	0,5257	0,4896
13	0,3845	0,5603
14	0,5351	0,4919
15	0,5094	0,5022

Све добијене вредности индекса тока које су мање од јединице (табела 5.7), потврђују псеудопластични карактер анализираних култивационих течности и оне су, уз факторе конзистенције, употребљене за израчунавање привидног вискозитета (табела 5.6).

У индустријским системима сматра се да је биосинтеза завршена када садржај извора угљеника износи мање од 5,00 g/l. Добијени резултати показују да је процес економски и еколошки неефикасан када се примењује иницијални садржај извора угљеника од 30,00 g/l јер, како је приказано у табели 5.6, значајне количине извора угљеника заостају у култивационој течности. У поређењу са иницијалном концентрацијом азота и фосфора у хранљивим подлогама, њихов садржај је значајно смањен у свим експериментима и вредности степена конверзије износе 50,00-94,50% и 46,68-68,10% за азот и фосфор, редоследом. Поред производње тржишно вредног производа, минимизацијом садржаја резидуалних нутријената могу се остварити значајни еколошки и економски бенефити, као и олакшавање издвајања и пречишћавања производа.

Резултати фитовања одабраних одзива полиномом другог реда су приказани у табели 5.8. и 5.9. Резултати су статистички обрађени анализом варијансе са нивоом значајности од 0,05 (интервал поверења 95%). Коефицијент детерминације и *p*-вредности модела су примењене за процену тачности модела. Значајност сваког коефицијента у добијеном моделу полинома другог реда је одређена *p*-вредношћу и статистички значајни коефицијенти су означени у табели 5.8.

За одзив садржаја ксантана коефицијент детерминације (R^2) износи 0,972 што указује на високу корелацију између добијених и предвиђених вредности. Најзначајнији утицаји имају линеарни и квадратни регресиони коефицијент иницијалног садржај извора угљеника као и коефицијент интеракције азота и фосфора (табела 5.8). Ови утицаји ће детаљније бити објашњени приликом дискусије слике 5.4.

Табела 5.8. Кофицијенти регресионе једначине моделованих одзива за биосинтезу ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

Одзиви	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄		Y ₅	
	P [g/l]		η _a [mPas]		rS [g/l]		rN _{uk} [g/l]		rP _{uk} [g/l]	
Ефекти	К	ρ	К	ρ	К	ρ	К	ρ	К	ρ
одсечак										
b ₀	-0,076	0,976	25,999*	0,0001	-6,726*	0,0038	0,0138	0,0815	-0,0263	0,1860
Линеарни										
b ₁	1,011*	0,003	0,891*	0,0025	0,530*	0,0036	0,0006	0,2658	0,0018	0,2303
b ₂	1,670	0,920	-137,6*	0,0002	26,782*	0,0290	-0,0668	0,1772	0,1961	0,1491
b ₃	8,322	0,289	-1,185	0,8524	11,007*	0,0376	-0,079*	0,008	0,4675*	0,0003
Квадратни										
b ₁₁	-0,016*	0,014	0,013*	0,0168	0,003	0,3134	-0,0000	0,1650	-0,0000	0,2190
b ₂₂	-96,724	0,121	415,87*	0,0002	-142,5*	0,0044	0,3909*	0,0377	-0,8963	0,0633
b ₃₃	-20,475	0,102	5,903	0,5329	-22,36*	0,0113	0,1071*	0,0115	-0,331*	0,0067
Интеракције										
b ₁₂	0,101	0,830	3,072*	0,0005	0,523	0,0908	0,0011	0,3985	0,0004	0,9008
b ₁₃	-0,247	0,269	0,120	0,5150	0,102	0,4001	0,0006	0,2993	0,0024	0,1571
b ₂₃	62,482*	0,037	-127,5*	0,0011	-14,000	0,3083	0,0401	0,5305	-0,1970	0,2754

К – кофицијент, * утицај који је значајан при $p < 0,05$

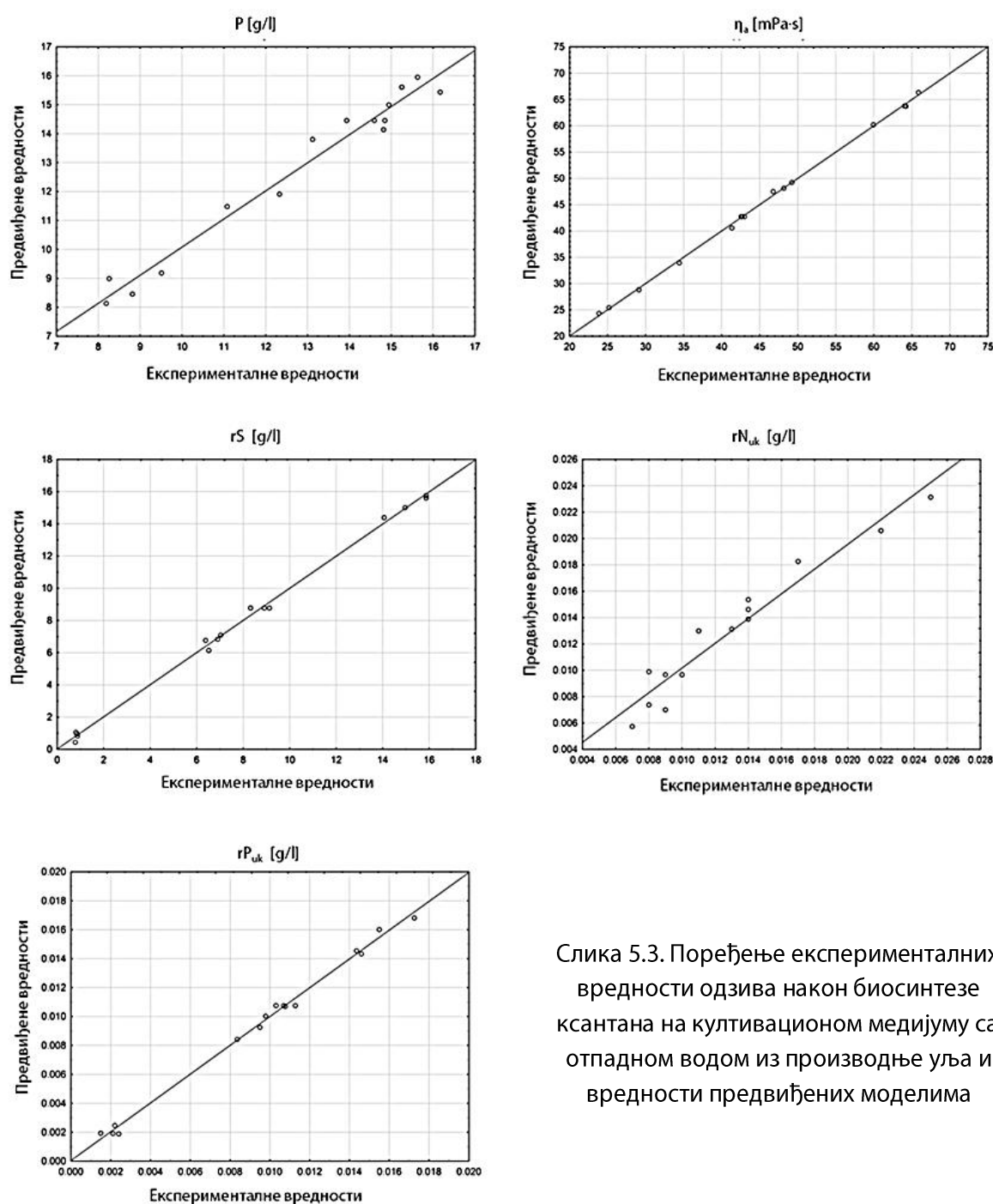
Вискозитет, укључујући привидни вискозитет, зависи од садржаја ксантана у култивационој течности, молекулске масе и структуре молекула биополимера, при чему на све њих утиче састав хранљиве подлоге и други параметри (Tait et al., 1986). Најзначајнији утицај на привидни вискозитет култивационе течности имају линеарни и квадратни регресиони кофицијенти почетног садржаја извора угљеника и азота као и кофицијент интеракције између извора угљеника и азота и између азота и фосфора. Током биосинтезе ксантана извор угљеника се користи како за раст ћелија тако и за биосинтезу производа за које су присуство одговарајућих извора азота и фосфора неопходни и имају велики значај (Souw and Demain, 1979). Стога је очекивано да на одзив резидуалног садржаја угљеника утиче иницијални садржај ових нутријената (линеарни регресиони кофицијент иницијалног садржаја извора угљеника, азота и фосфора и квадратни кофицијент почетног азота и фосфора). Ово веома јасно указује да се на потрошњу извора угљеника може утицати лимитирањем садржаја азота и фосфора, или односа ових нутријената. Значајни утицаји на одзив садржаја резидуалног азота имају линеарни и квадратни кофицијент почетног фосфора, као и квадратни кофицијент садржаја почетног азота, док је за одзив резидуалног фосфора најзначајнији линеарни и квадратни кофицијент иницијалног фосфора, што указује да су ови нутријенти значајни за метаболизам производног микроорганизма у почетним фазама култивације.

Вредности кофицијента детерминације (табела 5.9) свих добијених одзива су високе и блиске јединици што указује на добро фитовање експерименталних података са полиномом другог реда. Само вредност одзива садржаја резидуалног азота има донекле нижу вредност (0,939). F-вредности од 392,8060; 6940,800; 660,7866; 59,41991 и 491,7948 за садржај ксантана (Y₁), привидни вискозитет култивационе течности (Y₂), садржај резидуалног угљеника (Y₃), садржај резидуалног азота (Y₄) и садржај резидуалног фосфора (Y₅), редоследом, указују да су модели за одабране одзиве значајни. Поред тога, поређење између експерименталних и моделом предвиђених вредности за одабране одзиве је приказано на слици 5.3.

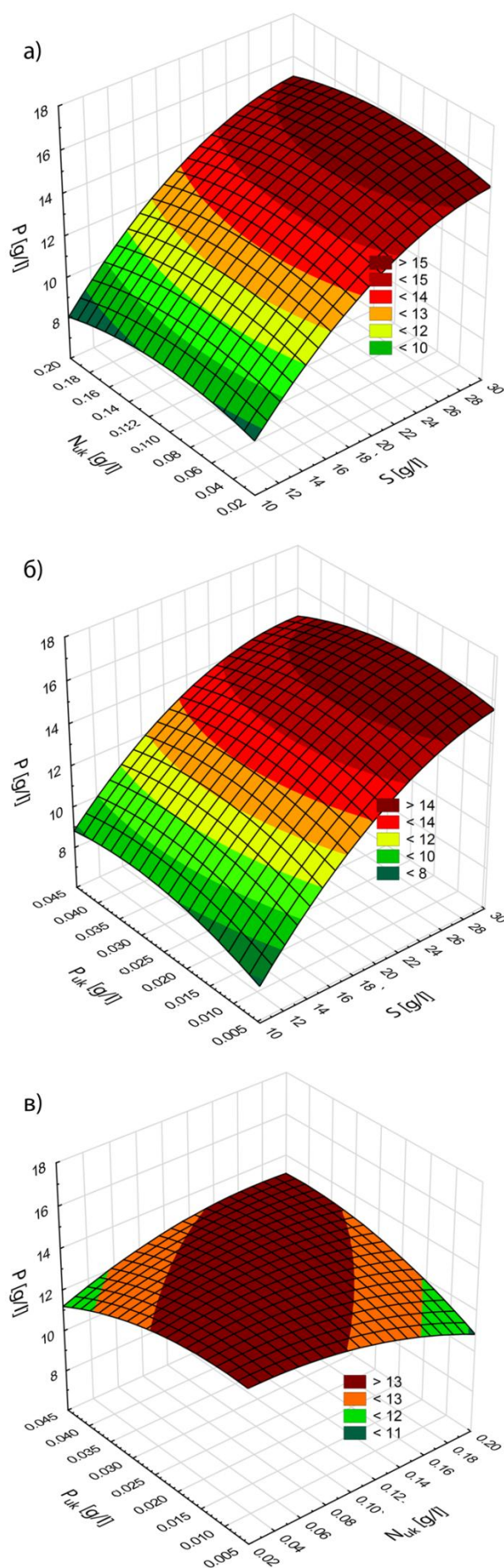
Табела 5.9. Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за биосинтезу ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

Одзив	Резидуал			Модел			F	p-вредност	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Y1	5	3,253	0,6506	10	2555,42	255,54	392,8060	0,000001	0,972
Y2	5	2,41	0,483	10	33501,32	3350,132	6940,800	0,00000001	0,999
Y3	5	1,013	0,2026	10	1338,540	133,8540	660,7866	0,0000004	0,998
Y4	5	0,000023	0,000005	10	0,002792	0,000279	59,41991	0,000146	0,939
Y5	5	0,000172	0,000034	10	0,169177	0,016918	491,7948	0,000001	0,995

DF – степени слобде; SS – сума квадрата; MS – средња вредност квадрата.



Слика 5.3. Поређење експерименталних вредности одзива након биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља и вредности предвиђених моделима



Површине одзива цртане су тако што је један од фактора имао константну вредност из центра плана, док су преостала два фактора варирана. На слици 5.4. приказан је утицај почетног садржаја извора угљеника, азота и фосфора на садржај ксантана.

Одзивна површина приказана на слици 5.4.а. недвосмислено указује да при садржају фосфора од 0,025 g/l, садржај почетног азота у испитаном опсегу има веома мали утицај на садржај ксантана, док је утицај концентрације извора угљеника (10,00-30,00 g/l) изражен и при повећању његове концентрације у култивационом медијуму за производњу ксантана повећава се и садржај добијеног производа. Поред тога најзначајнији утицаји су описани линеарним ($p=0,003$) и квадратним ($p=0,014$) коефицијентом почетног садржаја извора угљеника чиме је потврђено да концентрација извора угљеника утиче на садржај ксантана (Palaniraj and Jayaraman, 2011). Ови резултати су у складу са литературним наводима (Salah et al., 2010) и показују да извор угљеника има значајнији утицај на количину синтетисаног ксантана у односу на извор азота, под условом да азота има у довољној количини.

Слика 5.4. Садржај ксантана у култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља, као функција две променљиве при константној вредности треће:

- а – садржај фосфора (0,025 g/l);
- б – садржај азота (0,11 g/l);
- в – садржај извора угљеника (20,00 g/l)

Одзивна површина (слика 5.4.а) показује да се максималан садржај ксантана (15,00-16,00 g/l) добија при садржају извора угљеника већој од 26 g/l, за све примењене вредности почетног садржаја азота. На основу овога се може закључити да висок однос садржаја извора угљеника и азота или лимитирајућег нутријента, који може бити азот, фосфор или сумпор, позитивно утиче на биосинтезу ксантана и у случајевима када је азот лимитирајући нутријент, висок C/N однос је неопходан како би се стимулисала производња (Lo et al., 1997).

Слика 5.4.б. показује да је утицај почетног садржаја извора угљеника и фосфора при константној вредности садржаја азота (0,11 g/l) на садржај ксантана сличан као утицај почетног садржаја извора угљеника и азота при константној вредности садржаја фосфора. Са одзивне површине се може видети да је максималан садржај ксантана (15,00-16,00 g/l) добијен при концентрацији извора угљеника већој од 26 g/l у целом испитаном опсегу примењених концентрација фосфора, међутим донекле више вредности (око 16,00 g/l) су добијене применом нижих садржаја почетног фосфора (0,01-0,03 g/l). Такође се може видети да при константном садржају азота промена садржаја фосфора не утиче значајно на садржај ксантана, док при константном садржају фосфора промена садржаја извора угљеника значајно утиче на садржај добијеног ксантана у целом испитиваном опсегу.

Утицај садржаја почетног азота и фосфора на садржај ксантана током биосинтезе, при садржају извора угљеника од 20 g/l је приказана на слици 5.4.в. Интеракција садржаја азота и фосфора има статистички значајан утицај ($p=0,036$) на садржај ксантана и њихова позитивна интеракција (табела 5.8) указује на синергистички утицај. Ниже вредности садржаја ксантана (око 10 g/l) су добијене при највишем примењеном садржају укупног фосфора (око 0,04-0,045 g/l) и најнижем примењеном садржају азота ($<0,04$ g/l), као и при најнижем примењеном садржају фосфора ($<0,015$ g/l) и највишем примењеном садржају азота (око 0,18-0,2 g/l). Слика 5.4.в. такође показује да је максимална концентрација ксантана (око 13 g/l) добијена када је култивациони медијум садржао униформни однос азота и фосфора у целом испитиваном опсегу. На основу добијених резултата и са циљем добијања највећег могућег садржаја ксантана, у примењеним експерименталним условима може се закључити да однос садржаја азота и фосфора у култивационом медијуму који садржи отпадну воду из производње јестивог уља треба да буде приближно 4:1.

У овом делу истраживања метода жељене функције је примењена како би се оптимизовао састав култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља за производњу биополимера ксантана. У циљу одређивања оптималног опсега садржаја нутријента, угљеника, азота и фосфора, за неометано одвијање производње ксантана постављени су интервали захтеваних вредности одзива. За одзив садржаја ксантана дефинисан је интервал вредности од 12,00 до 16,17 g/l узимајући у обзир да количине ксантана које су мање од задатих нису оправдане са аспекта издвајања и пречишћавања производа. Дефинисани интервал привидног вискозитета култивационе течности износи 23,87-65,87 mPa·s и представља цео опсег добијених вредности. Интервал вредности резидуалног садржаја извора угљеника износи 0,78-5,00 g/l, с обзиром да 5,00 g/l представља критичну вредност у индустријским системима. Поред тога, дефинисани интервал за резидуални садржај азота је 0,007-0,01 g/l, а за резидуални садржај фосфора 0,0015-0,01 g/l са циљем смањивања почетних количина ових нутријента примењеним култивационим медијумима. Уобичајени поступак нумеричке оптимизације је дао велики број комбинација варираних експерименталних фактора за које вредност укупне жељене функције износи 1,00 и у табели 5.10. је приказано 10 одабраних решења.

Табела 5.10. Одабрани резултати оптимизације састава култивационог медијума са отпадном водом из производње уља: процењене вредности

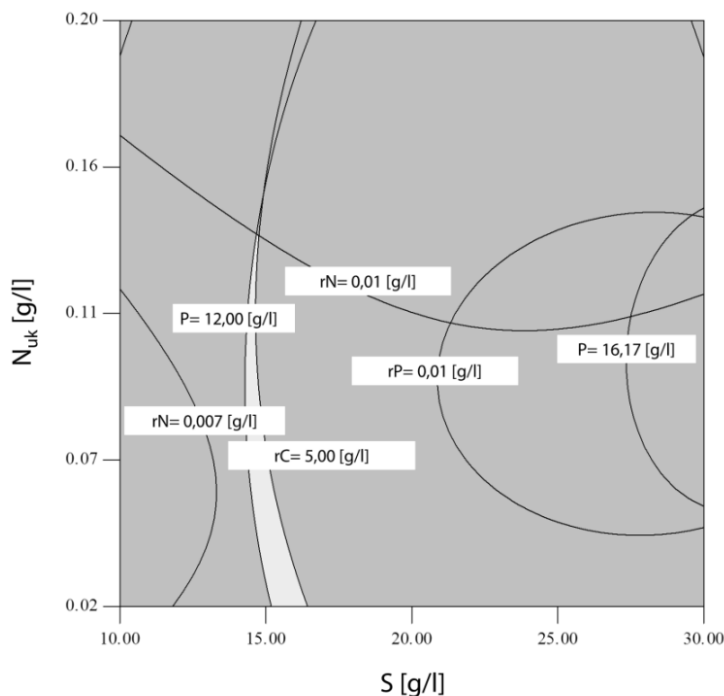
решење	S [g/l]	N _{uk} [g/l]	P _{uk} [g/l]	P [g/l]	η _a [mPas]	rS [g/l]	rN _{uk} [g/l]	rP _{uk} [g/l]	D
1	14,73	0,04	0,02	12,05	37,83	4,40	0,0077	0,0089	1,000
2	14,78	0,03	0,02	12,03	38,72	4,17	0,0086	0,0078	1,000
3	16,27	0,02	0,02	12,52	42,11	4,90	0,0082	0,0091	1,000
4	14,80	0,14	0,02	12,11	33,38	5,00	0,0100	0,0099	1,000
5	14,99	0,03	0,02	12,06	39,32	4,30	0,0079	0,0088	1,000
6	14,48	0,12	0,02	12,00	33,34	4,87	0,0091	0,0094	1,000
7	14,31	0,10	0,02	12,00	33,67	4,76	0,0081	0,0095	1,000
8	14,68	0,13	0,02	12,03	33,46	4,95	0,0098	0,0094	1,000
9	14,74	0,13	0,02	12,06	33,52	4,99	0,0099	0,0094	1,000
10	14,39	0,11	0,02	12,01	33,52	4,82	0,0086	0,0093	1,000

D-вредност жељене функције

Примењеним поступком, за захтеване услове оптимизације, софтвер процењује тачне вредности за све факторе/одзиве релевантне за оптимизацију (табела 5.10). Добијени резултати показују да је оптимизован садржај извора угљеника између 14,31 и 14,99 g/l, изузев једне вредности која износи 16,27 g/l, оптимизован садржај фосфора је исти у свим комбинацијама и износи 0,02 g/l, док се вредност за оптимизован садржај азота креће у ширим границама и износи 0,02-0,14 g/l.

У условима производње у индустријским размерама готово је немогуће постићи да вредности независних променљивих (садржај извора угљеника, азота и фосфора) буду тачно онакве какве су оптимизацијом предвиђене, што би, уз максималну вредност укупне жељене функције, омогућило идеално предвиђање вредности одзива (садржаја ксантана, привидног вискозитета култивационе течности, резидуалног садржаја извора угљеника, резидуалног садржаја азота и резидуалног фосфора). Стога је неопходно проценити интервале вредности независних променљивих за које ће процењене вредности одзива бити прихватљиве. Ови интервали вредности, односно оптимални услови могу се графички представити преклапањем контура различитих одзивних површина у суперпонирани дијаграм (Ahmad et al., 2007). Слика 5.5. приказује суперпонирани дијаграм одабраних одзива (садржај ксантана, привидни вискозитет култивационе течности, резидуални садржај извора угљеника, резидуални садржај азота и резидуални садржај фосфора) као функцију садржаја извора угљеника и азота у испитиваним опсезима и при константном почетном садржају фосфора од 0,02 g/l, како је предвиђено и нумеричком оптимизацијом. Светло сива поља представљају опсеге варираних фактора у којима су задовољени сви захтевани услови, док тамно сива поља представљају опсеге фактора где један или више захтеваних услова није задовољен.

Суперпонирани дијаграм приказан на слици 5.5. показује да је при почетном садржају фосфора од 0,02 g/l производња ксантана могућа када се у медијум који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља дода између 15,00-16,00 g/l извора угљеника и око 0,02-0,11 g/l азота. У том случају могуће је добити око 12,00 g/l ксантана, уз заостајање око 5,00 g/l извора угљеника и 0,01 g/l азота. Добијени резултати су у складу са раније објављеним научним радовима (Souw and Demain, 1979; Kurbanoglu and Kurbanoglu, 2007; Moshaf et al., 2011) у којима се наводи да је низак садржај азота погодан за биосинтезу ксантана.



Слика 5.5. Суперпонирани дијаграми одабраних одзива након биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља, у функцији садржаја извора угљеника и азота при константној вредности почетног садржаја фосфора (0,02 g/l)

Са циљем валидације развијених модела изведена су три додатна експеримента, применом истих експерименталних услова и средњих вредности фактора из добијеног опсега оптималног састава култивационог медијума. Добијени резултати су приказани у табели 5.11. и показују да се експериментално добијене вредности слажу са предвиђеним вредностима развијених модела посматраних одзива.

Табела 5.11. Резултати валидације развијених модела при оптимизованом саставу култивационог медијума са отпадном водом из производње уља

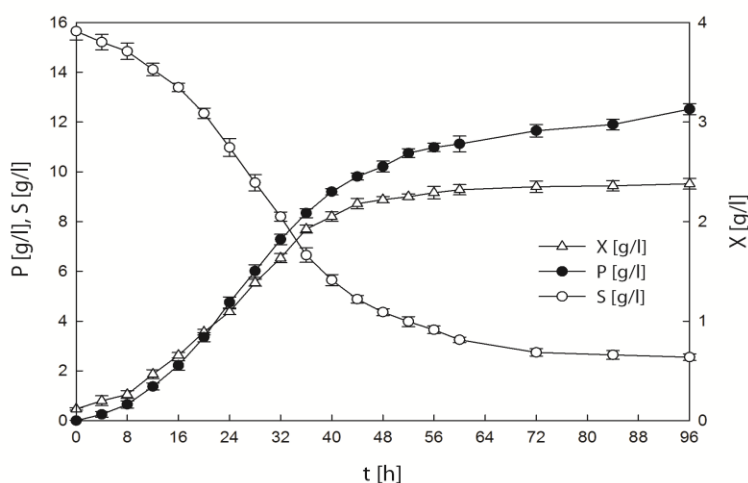
	Експериментално добијене вредности	Вредности предвиђене моделом
P [g/l]	12,06 ± 0,19	11,79
η_a [mPas]	38,32 ± 2,08	38,67
rS [g/l]	3,87 ± 0,27	3,953
rN_{uk} [g/l]	0,015 ± 0,002	0,016
rP_{uk} [g/l]	0,009 ± 0,001	0,008

Резултати добијени оптимизацијом су искоришћени за припрему култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља, као и за припрему полусинтетичке подлоге са глукозом, примењених за биосинтезу ксантана у увећаним размерама.

5.2.4. КИНЕТИКА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНОМ МЕДИЈУМУ СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА И НА ПОЛУСИНТЕТИЧКОЈ ПОДЛОЗИ СА ГЛУКОЗОМ

У овом делу истраживања испитана је кинетика дисконтинуалног поступка производње ксантана применом производног микроорганизма *Xanthomonas campestris* ATCC13951 у биореактору запремине 3 l. Такође, овим експериментима је изведено испитивање применљивости, у увећаним размерама, развијених математичких модела добијених у претходној фази истраживања, односно приликом оптимизације садржаја извора угљеника, азота и фосфора у медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља са циљем добијања максимално могућег садржаја жељеног производа уз минимално заостајање додатих нутријената. Промена садржаја биомасе, ксантана и садржаја извора угљеника током 96 часова култивације на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља обogaћену нутријентима у количинама које одговарају средњим вредностима оптимизованих независних променљивих (садржај извора угљеника 15,5 g/l, садржај азота 0,065 g/l и садржај фосфора 0,0145 g/l) у увећаним размерама, је приказана на слици 5.6.

Са слике 5.6. се може видети да садржај биомасе почиње благо али константно да расте непосредно након инокулације култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља. Нешто интензивнији пораст садржаја биомасе се уочава након 8-ог часа биосинтезе и траје до 36-ог часа када овај тренд полако успорава и након 48-ог часа остаје готово непромењен до краја биопроцеса. Након 48-ог часа биосинтезе, очигледна је стационарна фаза раста у којој се производни микроорганизам налази до краја биопроцеса и у којој садржај биомасе има вредности око 2,38 g/l. Ова вредност је донекле нижа од вредности садржаја биомасе (2,59 g/l) добијене при производњи ксантана применом разблаженог кухињског отпада као култивационог медијума (Li et al., 2016). До биосинтезе ксантана долази непосредно након инокулације култивационог медијума и одређена количина (0,25 g/l), која делимично потиче и од инокулума, је детектована већ у 4-ом часу. Итензивнија продукција започиње након 8-ог часа и траје до 48-ог часа биосинтезе. Након тога, пораст садржаја ксантана

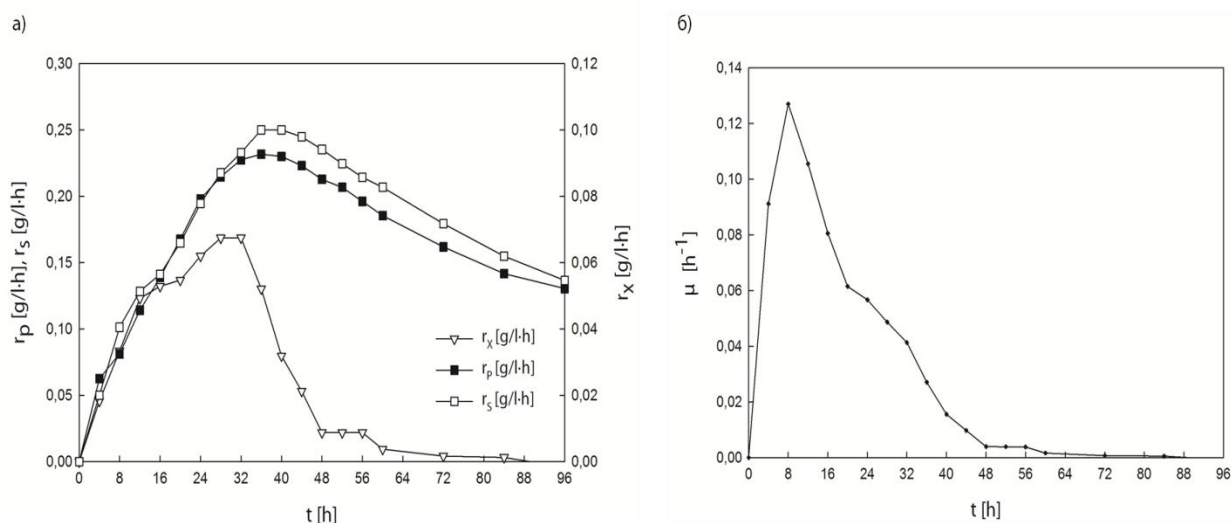


Слика 5.6. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

је нешто мање интензиван али константан до краја биопроцеса, када достиже 12,52 g/l. Што се тиче потрошње примењеног извора угљеника, односно садржаја глукозе, са слике 5.6. може се видети да њен садржај током процеса константно опада. У првих 8 часова садржај глукозе благо опада, након чега овај тренд постаје интензивнији и њен садржај се значајније смањује до 48-ог часа и вредности од 4,36 g/l. Након 48-ог часа, промена садржаја извора угљеника је у мањој мери изражена, међутим константно се смањује до 2,55 g/l.

За потребе кинетичког моделовања и дефинисања кинетике настајања биомасе и производа и кинетике потрошње извора угљеника, од значаја је праћење управо садржаја биомасе, ксантана и извора угљеника у дефинисаним временским интервалима биопроцеса. Са циљем добијања ових резултата, уз ненарушавање радне запремине биореакције, вредности осталих значајних параметара биосинтезе ксантана, привидног вискозитета култивационе течности, садржаја азота и фосфора, су измерене само у 96-ом часу биопроцеса. Добијени резултати показују да садржај ксантана, привидни вискозитет култивационе течности, резидуални садржај угљеника, резидуални садржај азота и резидуални садржај фосфора након извођења биопроцеса у увећаним размерама, имају вредности од 12,52 g/l, 41,90 mPa·s, 2,55 g/l, 0,015 g/l и 0,008 g/l, редоследом. Уколико се ове вредности упореде са вредностима које развијени модели предвиђају (табела 5.11), а које износе 11,79 g/l за садржај ксантана, 38,67 mPa·s за привидни вискозитет култивационе течности, 3,953 g/l за резидуални садржај извора угљеника, 0,016 g/l за резидуални садржај азота и 0,008 g/l за резидуални садржај фосфора, може се уочити добро слагање добијених експерименталних вредности са вредностима предвиђеним моделом. Веће вредности садржаја ксантана и привидног вискозитета култивационе течности добијене након извођења биосинтезе у увећаним размерама, као и ниже или исте вредности резидуалног садржаја извора угљеника, азота и фосфора могу бити последица интензивнијих услова у биореактору, односно интензивније аерације и мешања који побољшавају пренос масе кисеоника а самим тим утичу на повећање количине раствореног кисеоника који позитивно утиче на испитани биопроцес (Borges et al., 2008; Cheng et al., 2011).

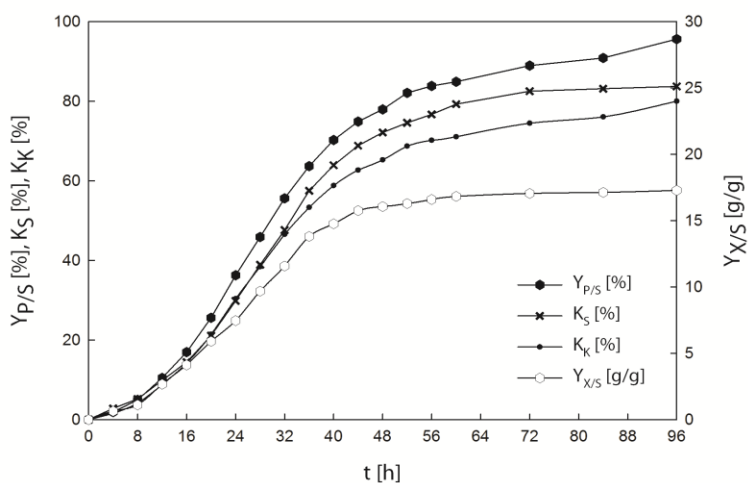
На слици 5.7. приказане су вредности брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника и брзине производње биомасе, као и вредности специфичне брзине раста током 96 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља. Од момента инокулације брзина настајања биомасе интензивно расте до 16-ог часа биосинтезе, након чега наставља да расте нешто блажим интензитетом и достиже максималну вредност у 32-ом часу када износи 0,068 g/l·h. Након достизања максималне вредности, брзина настајања биомасе почиње константно и интензивно да опада до 48 h, након чега наставља да опада блажим интензитетом до 64-ог часа када достиже вредност блиску нули и остаје непромењена до краја процеса. Овакве промене су и очекиване услед уласка производног микроорганизма у стационарну фазу раста (слика 5.6).



Слика 5.7. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

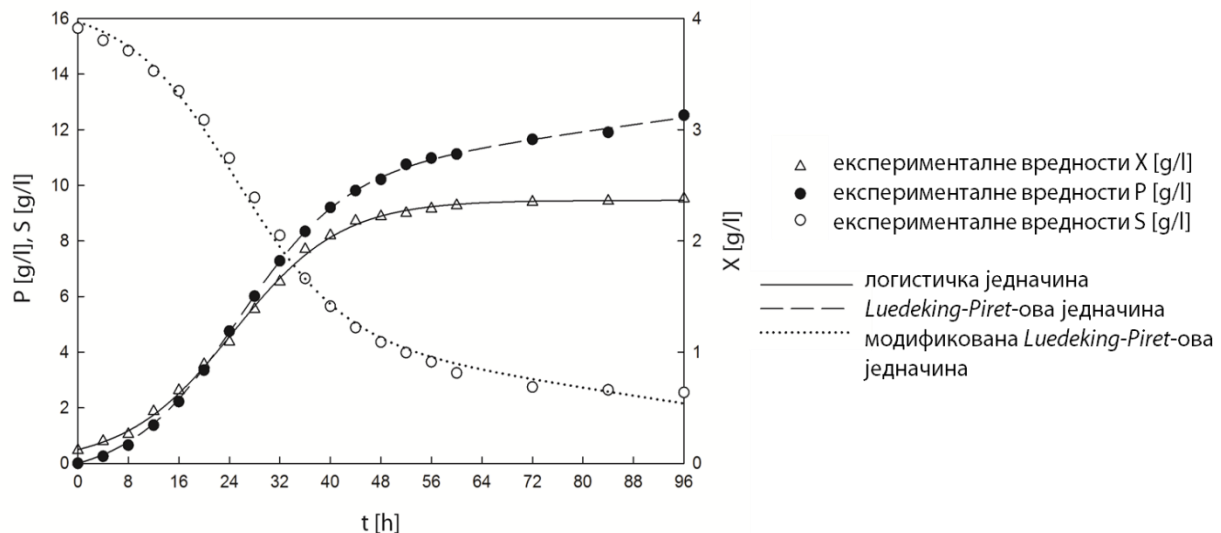
Брзина биосинтезе ксантана и брзина потрошње извора угљеника константно расту током првих 36 часова биосинтезе и достижу максималне вредности од 0,23 g/l·h и 0,25 g/l·h, редоследом. Након постизања максималне вредности брзине настајања ксантана и потрошње супстрата благо опадају до краја процеса и достижу вредности од 0,13 g/l·h и 0,14 g/l·h, редоследом. Брзина потрошње извора угљеника зависи у највећој мери од брзине раста ћелија производног микроорганизма и већа је током експоненцијалне, него током стационарне фазе раста (Gilani et al., 2011). Специфична брзина раста, приказана на слици 5.7.б, достиже своју максималну вредност већ у 8-ом часу култивације услед интензивног умножавања и пораста садржаја биомасе услед уласка у експоненцијалну фазу раста. Након достизања максималне вредности ($0,127 \text{ h}^{-1}$), специфична брзина раста започиње да опада и достиже вредност блиску нули у 48-ом часу и даље се, до краја биосинтезе, не мења значајније.

Промене коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника у ксантан, као и степена конверзије извора угљеника, израчунате на основу једначина (4.3), (4.4), (4.5) и (4.6), редоследом, током трајања биосинтезе ксантана су приказане на слици 5.8. Вредност коефицијента приноса биомасе интензивно расте првих 48 часова биопроцеса до 16,06 g/g, након чега достиже вредност од 17,28 g/g и остаје готово непромењена до 96-ог часа биосинтезе. Приказани резултати показују да вредност коефицијента приноса ксантана такође расте током целог биопроцеса, до 48-ог часа овај пораст је интензиван, када достиже 77,94%, а након уласка производног микроорганизма у стационарну фазу, његова вредност расте нешто блажим интензитетом и у 96-ом часу износи 95,57%. Степен конверзије извора угљеника и конверзија угљеника у ксантан очекивано расту током трајања култивације, првих 48 часова интензивније, а након тога блажим интензитетом и достижу крајње вредности од 80,00 и 83,70 %, редоследом.



Слика 5.8. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

Извођењем процеса под оптималним условима могуће је дефинисати његову кинетику, а дефинисање кинетичких модела веома је значајно за развој биотехнолошких процеса, с обзиром да утиче на контролу процеса, смањење његових трошкова и повећање квалитета готовог производа (Dodić et al., 2012b). На слици 5.9. приказана је кинетика умножавања биомасе (X), генерисања производа (P) и кинетика нестајања извора угљеника (S), односно приказани су добијени експериментални подаци и криве добијене фитовањем ових података у предложене кинетичке моделе применом софтверског пакета SigmaPlot®11. Поред тога, експериментално одређене вредности кинетичких параметара и вредности које предвиђају примењени модели су приказане у табели 5.12.



Слика 5.9. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

Експериментални подаци за садржај биомасе су фитовани у логистичку једначину (4.11) и добијена крива модела има узлазну путању и тренд сличан као крива општег микробиолошког раста (García-Ochoa et al., 1995). Поред тога, као резултат фитовања добијених експерименталних података у горенаведену једначину добијене су моделом предвиђене вредности почетног садржаја биомасе (X_0), максималног садржаја биомасе (X_m) и максималне специфичне брзине раста (μ_m), приказане у табели 5.12, при чему добијена вредност R^2 износи 0,9990. Почетна вредност концентрације ћелија коју предвиђа модел износи 0,1236 g/l је приближна експериментално добијеној вредности од 0,12 g/l. Поред тога, моделом предвиђене вредности максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста, износе 2,3654 g/l и 0,1176 h⁻¹, редоследом, се такође добро слажу са експериментално одређеним вредностима (2,38 g/l и 0,127 h⁻¹, редоследом). Према истраживањима која су извели Lo и сарадници (1997) вредност специфичне брзине раста, применом истог соја производног микроорганизама, износи 0,06-0,12 h⁻¹ и зависи од услова култивације. Сви добијени резултати указују да примењена логистичка једначина представља одговарајући кинетички модел за опис раста *Xanthomonas campestris* ATCC13951 у примењеним условима и применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља.

За добијање кинетичких параметара и описивање производње ксантана примењена је *Luedeking-Piret*-ова једначина (4.13) и резултати фитовања добијених експерименталних вредности садржаја ксантана са овим моделом су приказани на слици 5.9. Примењени модел показује да брзина производње ксантана зависи од садржаја биомасе и брзине настајања биомасе. Стога су вредности почетног садржаја биомасе, максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста које су предвиђене фитовањем експерименталних вредности за биомасу са логистичком једначином, а које су приказане у табели 5.12, употребљене као константе у *Luedeking-Piret*-овом моделу примењеном за фитовање експерименталних података количине ксантана током биосинтезе у примењеним условима. Добијени резултати показују да су вредности предвиђене моделом параметара α и β , односно параметра који је везан за раст и параметра који није везан за раст и које износе 4,5511 gP/gX и

0,0132 gP/gX·h, редоследом, веома блиске експериментално одређеним вредностима истих, 4,486 gP/gX и 0,013 gP/gX·h, редоследом. Одлично поклапање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности, као и чињеница да добијена вредност R^2 износи 0,9997 показују да се *Luedeking-Piret*-ов модел може применити за описивање производње ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља.

Табела 5.12. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

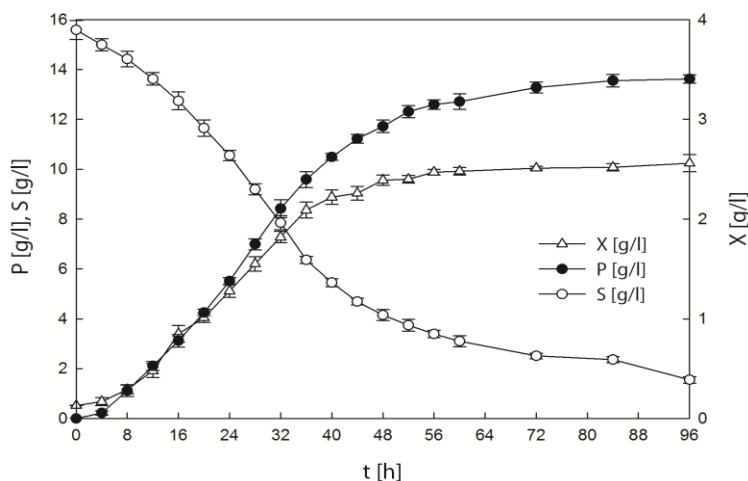
параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,1236 \pm 0,0071$	$0,12 \pm 0,01$
X_m [g/l]	$2,3654 \pm 0,0123$	$2,38 \pm 0,06$
μ_m [h ⁻¹]	$0,1176 \pm 0,0250$	0,127
α [gP/gX]	$4,5511 \pm 0,0226$	4,486
β [gP/gX·h]	$0,0132 \pm 0,0005$	0,013
S_0 [g/l]	$15,8700 \pm 0,1330$	$15,65 \pm 0,35$
γ [gS/gX]	$5,0212 \pm 0,1267$	4,2139
δ [gS/gX·h]	$0,0147 \pm 0,0022$	0,020

За описивање кинетике потрошње извора угљеника примењена је модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина (4.17) и резултати фитовања добијених експерименталних резултата са овим моделом су приказани на слици 5.9. С обзиром да према примењеном моделу на промену садржаја извора угљеника утиче садржај биомасе и брзина настајања биомасе, вредности почетног садржаја биомасе, максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста које су предвиђене фитовањем експерименталних вредности за биомасу са логистичком једначином, а које су приказане у табели 5.12, су употребљене као константе у модификованом *Luedeking-Piret*-овом моделу примењеном за фитовање експерименталних података садржаја извора угљеника током биосинтезе ксантана. Добијени резултати показују да постоји одлично слагање вредности почетног садржаја извора угљеника добијених експерименталним израчунавањем (15,65 g/l) и на основу предвиђања модела (15,87 g/l). Поред тога, вредности параметра који зависи од раста (γ) и параметра који не зависи од раста (δ), који су израчунати на основу експерименталних резултата и вредности предвиђених моделом су блиске, а статистички индикатор (R^2) износи 0,9970. Добијени резултати показују да модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина представља одговарајући модел за описивање потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана, у примењеним експерименталним условима, када је као основа медијума примењена отпадна вода из производње јестивог уља.

Како би се дефинисао модел постројења за производњу ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља и како би се извршила процена успешности овог биопроцеса, при истим условима је изведена биосинтеза ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом, одређени су кинетички параметри од значаја за процес и дефинисани кинетички модели за настајање биомасе и производа и нестајање супстрата односно извора угљеника.

Полусинтетичка подлога са глукозом је употребљена као слепа проба, односно за упоређивање свих показатеља успешности овог биотехнолошког процеса са процесом на култивационом медијуму са отпадном водом. Подлога овог састава је одабрана зато што се глукоза као извор угљеника веома често користи за биотехнолошку производњу ксантана.

На слици 5.10. приказана је промена садржаја биомасе, ксантана и извора угљеника током 96 часова биосинтезе. Непосредно након инокулације, у прва 4 часа биопроцеса долази до благог повећања садржаја биомасе, са вредности 0,13 g/l на 0,17 g/l. Након 4-ог часа долази до интензивнијег умножавања, односно уласка производног микроорганизама у експоненцијалну фазу раста која траје до 40-ог часа када садржај биомасе достиже вредност од 2,22 g/l. Између 40-ог и 60-ог часа уочава се смањење интензитета настајања биомасе и њен садржај у култивационом медијуму достиже вредност од 2,48 g/l. У последњих 36 часова биосинтезе производни микроорганизам се налази у стационарној фази раста и његов садржај остаје готово непромењен до краја биопроцеса и вредности од 2,56 g/l. Добијени резултати показују да се



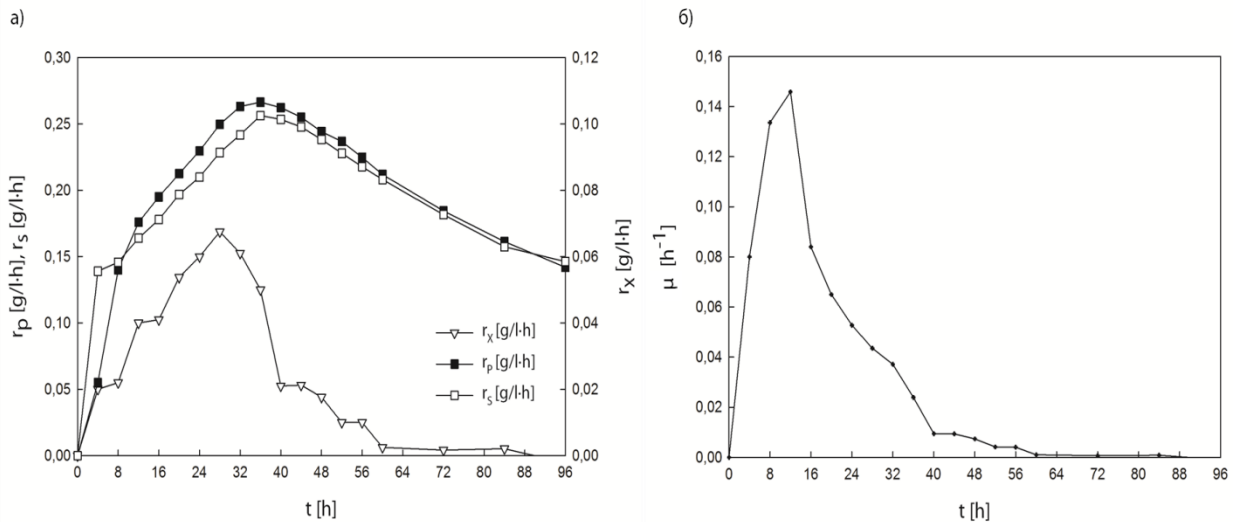
Слика 5.10. Ток биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

садржај глюкозе константно смањује током биопроцеса, са вредности која износи 15,59 g/l до 1,55 g/l коју достиже на крају биосинтезе. Садржај ксантана у култивационој течности се веома благо повећава у прва 4 часа биосинтезе након чега долази до интензивнијег повећавања и достизања 12,71 g/l у 60-ом часу. Након 60-ог часа уочава се благо али константно повећање његове вредности све до 96-ог часа, када је у култивационој течности детектовано 13,62 g/l жељеног производа.

Вредности осталих параметара од значаја за успешност биосинтезе ксантана, привидног вискозитета култивационе течности, садржаји азота и фосфора, су због одржавања радне запремине култивационе течности у биореактору одређене само на крају биопроцеса и износе 45,46 mPa·s, 0,012 g/l и 0,007 g/l, редоследом. Добијене вредности садржаја ксантана и привидног вискозитета култивационе течности су донекле више, а вредности резидуалних нутријената ниже, од вредности које су добијене након биосинтезе ксантана применом медијума који као основу садржи отпадну воду из производње уља, као и вредности предвиђене моделима који су исходили из оптимизационог експеримента (табела 5.11). Ови резултати се могу објаснити повољнијим условима у биореактору, у поређењу са експерименталним условима приликом извођења оптимизационог експеримента, као и повољнијим саставом полусинтетичке подлоге у поређењу са медијумом који као основу садржи отпадну воду.

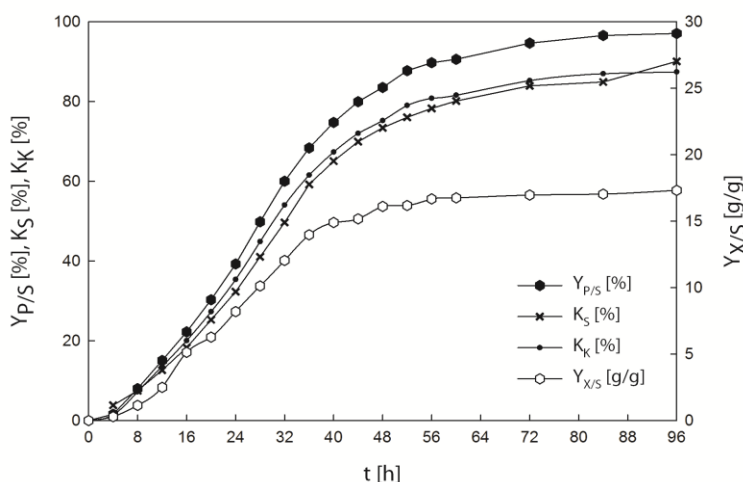
На слици 5.11. приказана је зависност брзине производње ксантана, брзине настајања биомасе и брзине потрошње извора угљеника, као и промена специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом. На основу добијених резултата може се уочити константно повећање брзине производње биомасе до 28-ог часа, када њена вредност достиже максималну 0,068 g/l·h, а потом интензивно смањење до 40-ог часа биосинтезе на вредност од 0,021 g/l·h. Након 40-ог часа, вредност брзине настајања биомасе наставља да се смањује до 60-ог часа када достиже вредност блиску нули, која до краја биосинтезе остаје непромењена.

Брзина настајања производа и брзина потрошње извора угљеника интензивно расту до 36-ог часа биосинтезе, достижући вредности од 0,266 g/l·h и 0,256 g/l·h, након чега се њихове вредности благо смањују до краја процеса и вредности од 0,142 g/l·h и 0,146 g/l·h, редоследом. Добијени резултати (слика 5.11.б) показују интензиван пораст вредности специфичне брзине раста до 12-ог часа биосинтезе и достизања максималне вредности од $0,146 \text{ h}^{-1}$. Након 12-ог часа долази до константног смањења њене вредности и достизања брзине чија је вредност блиска нули у 60-ом часу, а која остаје непромењена до краја биопроцеса.



Слика 5.11. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

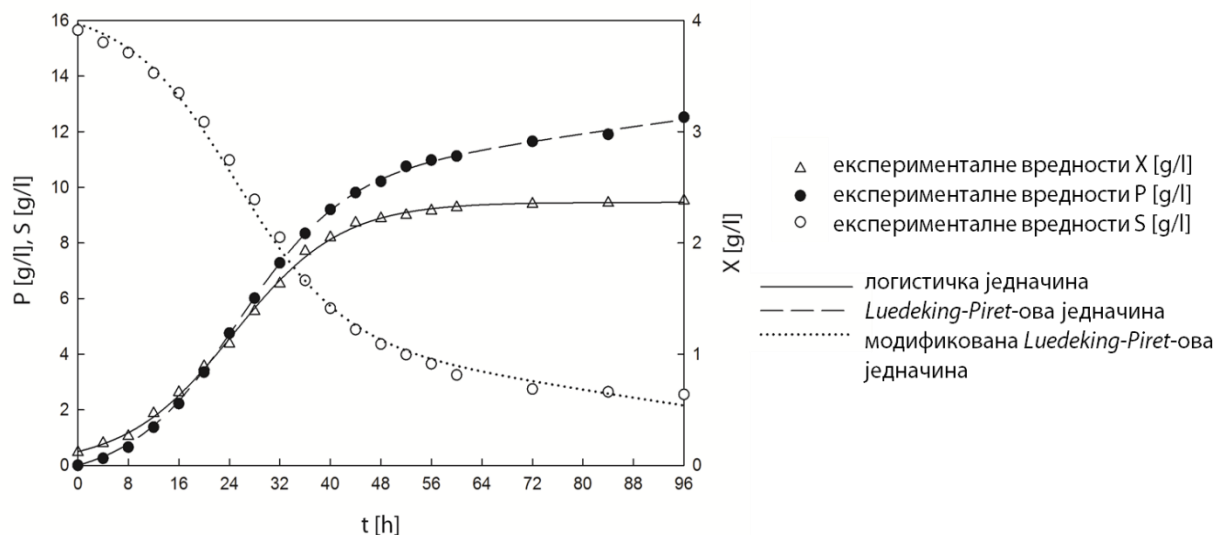
Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника у ксантан и степена конверзије извора угљеника, током биосинтезе ксантана



Слика 5.12. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на полусинтетичкој подлози са глукозом

на полусинтетичкој подлози са глукозом је приказана на слици 5.12. Вредност коефицијента приноса биомасе у односу на супстрат интензивније расте до 36-ог часа биосинтезе, када достиже вредност од 13,97 g/g, након чега његова вредност веома благо расте и достиже 17,31 g/g у 96-ом часу. Добијени резултати показују да се вредности приноса производа, конверзије извора угљеника и конверзије извора угљеника у ксантан повећавају током биопроцеса, уз достизање максималних вредности од 97,04%, 90,06% и 87,39%, редоследом.

Експериментално добијене вредности количине биомасе, производа и извора угљеника током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом су применом одговарајућег софтвера фитоване у предложене кинетичке моделе (једначине 4.11, 4.13 и 4.17) и добијени резултати, односно криве које описују кинетику настајања биомасе (X), кинетику настајања производа (P) и кинетику потрошње извора угљеника (S) су приказане на слици 5.13. Поред тога, вредности кинетичких параметара израчунате на основу експерименталних података и предвиђених примењеним моделима су приказане у табели 5.13.



Слика 5.13. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

Логистичка једначина је примењена за фитовање експерименталних података садржаја биомасе и моделом предвиђене вредности почетног садржаја биомасе, максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста износе $0,1453 \text{ g/l}$, $2,5172 \text{ g/l}$ и $0,1186 \text{ h}^{-1}$, редоследом. Добијени резултати показују адекватно слагање са вредностима израчунатим на основу експерименталних података ових параметара, који износе $0,13 \text{ g/l}$, $2,56 \text{ g/l}$ и $0,146 \text{ h}^{-1}$, редоследом. Поред тога вредност R^2 износи $0,9979$ што указује да примењена логистичка једначина одлично описује понашање, односно раст примењеног производног микроорганизма на полусинтетичкој подлози са глукозом.

Табела 5.13. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,1453 \pm 0,0121$	$0,13 \pm 0,003$
X_m [g/l]	$2,5172 \pm 0,0191$	$2,56 \pm 0,09$
μ_m [h ⁻¹]	$0,1186 \pm 0,0038$	$0,146$
α [gP/gX]	$4,8639 \pm 0,0543$	$4,668$
β [gP/gX·h]	$0,0132 \pm 0,0013$	$0,014$
S_0 [g/l]	$15,5354 \pm 0,1218$	$15,89 \pm 0,38$
γ [gS/gX]	$4,4669 \pm 0,1072$	$3,6804$
δ [gS/gX·h]	$0,0193 \pm 0,0018$	$0,023$

Luedeking-Piret-ова једначина је примењена за описивање кинетике настајања производа и резултати фитовања добијених експерименталних вредности садржаја ксантана са овим моделом су приказани на слици 5.13 и у табели 5.13. Добијени резултати показују да су вредности предвиђене примењеним моделом за параметар који је везана за раст (α) и параметар који није везан за раст (β) и које износе 4,8639 gP/gX и 0,0132 gP/gX·h, редоследом, веома блиске експериментално одређеним вредностима истих (4,668 gP/gX и 0,014 gP/gX·h, редоследом). Одлично поклапање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности, као и чињеница да добијена вредност R^2 износи 0,9986 показују да се *Luedeking-Piret*-ов модел може применити за описивање производње ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.

За описивање кинетике потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана примењена је модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина и резултати фитовања добијених експерименталних резултата овим моделом су приказани на слици 5.13. и у табели 5.13. На основу добијених резултата може се уочити одлично слагање експериментално израчунате вредности почетног садржаја извора угљеника од 15,89 g/l и моделом предвиђене вредности исте која износи 15,5354 g/l, као и слагање вредности параметра δ чија експериментална вредност износи 0,023 gS/gX·h, а моделом предвиђена 0,0193 gS/gX·h. Резултати приказани у табели 5.13. указују да само у случају параметра γ који представља параметар који је везан за раст, постоји разлика између експериментално одређене и моделом предвиђене вредности. Добијени резултати, као и вредност R^2 која износи 0,9976 показују да примењена модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина представља одговарајући модел за описивање потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом.

Добијени резултати указују да се логистичка, *Luedeking-Piret*-ова и модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина успешно могу применити за описивање кинетике настајања биомасе производног микроорганизма, кинетике биосинтезе производа и кинетике потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана применом полусинтетичке подлоге са глукозом као извором угљеника и применом култивационог медијума чија је основа отпадна вода из производње јестивог уља. Вредности добијених кинетичких параметара су примењене у софтверу за симулацију биотехнолошких процеса ради генерисања модела постројења за производњу ксантана применом полусинтетичке подлоге и медијума на бази горенаведене отпадне воде.

5.2.5. СИМУЛАЦИЈА ПРОЦЕСА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНОМ МЕДИЈУМУ СА ОТПАДНОМ ВОДОМ ИЗ ПРОИЗВОДЊЕ ЈЕСТИВОГ УЉА

Иако су многи софтверски пакети примењивани за симулацију различитих биопроцеса, у доступној научној и стручној литератури нема навода који се односе на примену *SuperPro Designer*-а за добијање модела биопроцеса производње ксантана на ефлуентима прехранбене индустрије, изузев истраживања која су проистекла из ове дисертације (Вајић et al., 2016b; Вајић et al., 2016c). Управо зато, циљ овог дела истраживања представља примена поменутог софтвера за генерисање модела биопроцеса производње ксантана применом отпадних ефлуената индустрије јестивог уља и његово поређење са биопроцесом који користи полусинтетичку подлогу са глукозом. Резултати овакве упоредне анализе могу да укажу на критичне сегменте испитиваног производног процеса, а потом се искористе у даљем истраживању за побољшање управо тих сегмената, а самим тим и продуктивности читавог биопроцеса.

Резултати добијени у претходном делу истраживања који обухватају кинетичке параметре добијене дефинисањем кинетичких модела за настајање биомасе, синтезу ксантана и потрошњу извора угљеника током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње уља и на полусинтетичкој подлози са глукозом, су примењени у развијеном моделу биопроцеса, који је приказан на слици 5.14. и описан у даљем тексту.

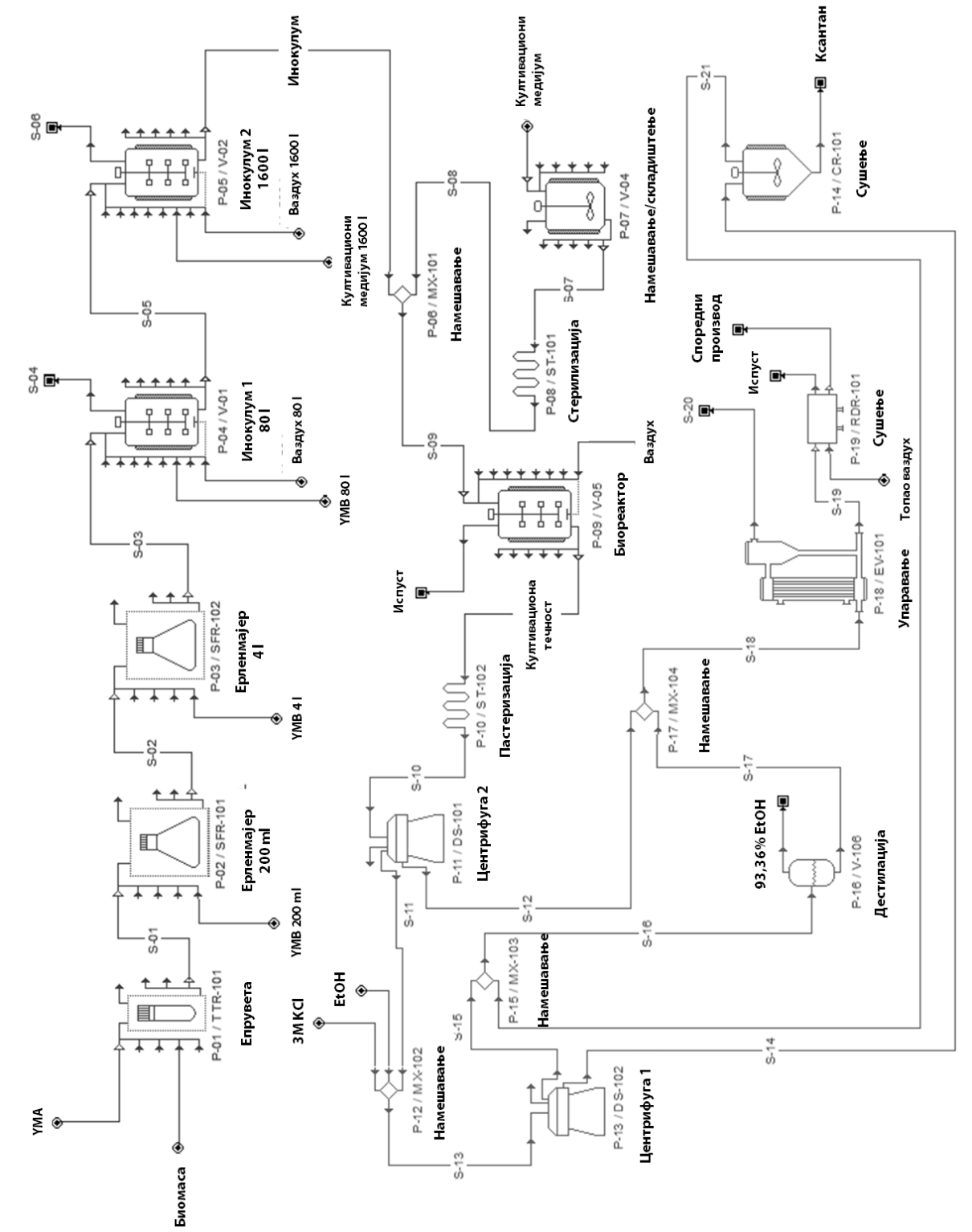
Сви подаци за улазне токове и оперативне услове су добијени на основу експерименталних резултата приказаних у овом раду, док су подаци везани за опрему и сам биопроцес добијени директно из примењеног програма. Количина медијума предвиђена за једну шаржу, а која износи 20000 l, добијена је из односа доступне количине отпадне воде и максималног броја шаржи који је могућ у току кампање. Као култивациони медијум за производњу ксантана примењена је или полусинтетичка подлога са глукозом или отпадна вода из производње јестивог уља која представља основу култивационог медијума који се припрема намешавањем са нутријентима неопходним за метаболизам производног микроорганизама (извори угљеника, азота, фосфора и минералне материје) у танку за намешавање/складиштење, приказаном на слици 5.14. Из овог танка припремљена хранљива подлога односно култивациони медијум се шаље на стерилизацију. Стерилисани медијум се затим инокулише и уводи у биореактор у ком се изводи биосинтеза.

Инокулум је припремљен из епрувете, два ерленмајера и два биореактора растућих запремина на комерцијалној подлози (квашчев малтозни агар (YMA) и одговарајући бујон (YMB)) и култивационом медијуму у последњој фази припреме. Реакције и конверзије у биопроцесу су дефинисане кинетиком која је описана у претходном поглављу овог рада (табела 5.12. и табела 5.13). У табели 5.14. приказани су подаци добијени из симулације модела биопроцеса производње ксантана као резултат примене дефинисаних кинетичких модела (табела 5.12. и табела 5.13). Графички прикази токова култивације на анализираним медијумима, као резултат симулације приказани су на слици 5.15. Добијени састав медијума који садржи отпадну воду из производње уља и полусинтетичке подлоге са глукозом, пре и након биореакције, као и одговарајући токови биосинтезе, показују да симулација на задовољавајући начин може да опише експерименталне резултате.

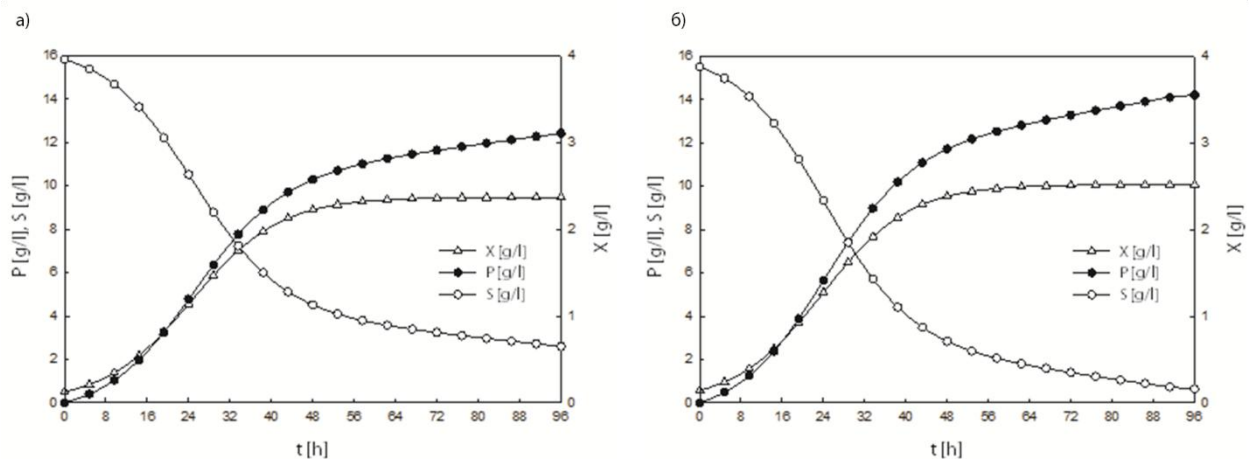
Табела 5.14. Симулирани састав медијума пре и након биореакције добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља

састав тока		медијум са отпадном водом из производње уља	подлога са глукозом
пре биореакције	X [g/l]	0,124	0,15
	X [%]	0,013	0,0158
	S [g/l]	15,69	15,30
	S [%]	1,68	1,64
	остало* [%]	98,31	98,35
након биореакције	X [g/l]	2,36	2,51
	X [%]	0,25	0,27
	S [g/l]	2,66	0,65
	S [%]	0,28	0,07
	P [g/l]	12,51	14,20
	P [%]	1,34	1,52
остало* [%]	98,13	98,14	

* остало – вода, производи метаболизма и неизреаговали нутријенти



Слика 5.14. Дијаграм тока производње ксантана



Слика 5.15. Симулација тока биосинтезе ксантана на (а) култивационом медијуму са отпадном водом из производње уља и (б) полусинтетичкој подлози са глукозом

Након биосинтезе ксантана добијена култивациона течност је прво пастеризована како би се производни микроорганизам инактивирао, а потом центрифугирана ради сепарације биомасе. Након тога, супернатант је таложен етанолом и засићеним раствором KCl , потом центрифугиран и на крају сушен како би се добио готов производ.

Течна фракција добијена после друге центрифуге као и течна фракција добијена након сушења финалног производа су усмерене на дестилацију ради издвајања етанола који се потом може рециркулисати и користити за таложење ксантана из следеће шарже. Чврста фракција добијена након прве центрифуге, а која се углавном састоји од бактеријских ћелија заједно са цибром добијеном након дестилације етанола су усмерене на упаривач, а затим сушење како би се добио споредни производ, који не представља отпад, већ се у зависности од састава може, са или без додатне обраде, применити као ђубриво, храна за стоку или потенцијално рециркулисати и поново користити као основа култивационог медијума за биосинтезу ксантана.

Као резултат симулације ових резултата у развијеном моделу, у табели 5.15. је приказана економска анализа модела биопроцеса производње ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља и на полусинтетичкој подлози са глукозом.

Приликом економске анализе развијеног модела у обзир нису узети инвестициони трошкови, односно претпоставља се да постројење за производњу ксантана применом полусинтетичке подлоге и медијума са ефлуентом већ постоји, а с обзиром да је исто постројење у питању радни капитал има исту вредност од 16000 \$, док се оперативни трошкови разликују у малој мери и износе 179000 и 183000 \$/god.

Продуктивност процеса производње ксантана применом отпадне воде из производње јестивог уља као основе култивационог медијума износи 21294,29 kg/god, док применом полусинтетичке подлоге са глукозом има вредност од 23107,97 kg/god. Поред тога, јединична цена производње износи 8,57 \$/kg и 7,72 \$/kg за производњу применом отпадне воде као основе медијума, односно полусинтетичке подлоге, редоследом, што указује да је потребно побољшати неке од значајних аспеката биопроцеса како би се повећала његова профитабилност и примена отпадне воде из производње јестивог уља као сировине била исплатива. Међутим, битно је нагласити да

с обзиром да је рециклирање односно поновна употреба отпадне воде један од циљева одрживог развоја (Jhansi and Mishra, 2013), добијени резултати имају велики значај са аспекта заштите животне средине и предложени модел представља корисну алатку у повећању размера овог процеса са лабораториског на индустријски ниво.

Табела 5.15. Економски показатељи модела биопроцеса производње ксантана применом култивационог медијума са отпадном водом из производње уља или полусинтетичке подлоге са глукозом

	радни капитал [\$]	оперативни трошкови [\$/god]	продуктивност [kg/god]	јединична цена производње [\$/kg]	укупни приходи [\$/god]
полусинтетичка подлога са глукозом	16000	178000	23107,97	7,72	117000
медијум са отпадном водом из производње јестивог уља	16000	183000	21294,29	8,57	108000

Резултати анализе симулационог модела недвосмислено указују да како би процес био економски исплатив, количина добијеног производа мора бити већа од око 20,00 g/l. Међутим, без обзира на уложен труд није реално очекивати да принос ксантана буде већи од око 35,00 g/l услед дифузионих ограничења преносу масе кисеоника у веома вискозном систему (Garcia-Ochoa et al., 2000b; Rosalam and England, 2006). Са циљем смањења производних трошкова и повећања конкурентности ксантана на тржишту, неопходно је побољшати продуктивност процеса развојем ефикаснијег поступка производње, оптимизацијом састава култивационог медијума за његову производњу или изоловањем нових сојева *Xanthomonas campestris* који имају могућност боље производне способности у предвиђеним експерименталним условима (Kamal et al., 2003).

С обзиром да побољшање количине жељеног производа може бити остварено применом погодног култивационог медијума који се користи за његову производњу, од великог је значаја управо одабир и оптимизација састава култивационог медијума, у погледу најзначајнијих макро и микронутријената, који се користи за његову производњу (Salah et al., 2010; Jeeva et al., 2011; Khosravi-Darani et al., 2011; Niknezhad et al., 2015; Ghashghaei et al., 2016).

Такође, велики значај има и оптимизација и одабир одговарајућих процесних параметара, као што су мешање, аерација, време култивације, геометрија примењеног биореактора, расподељивача ваздуха и мешача (Amanullah et al., 1998; Psomas et al., 2007; Mirik et al., 2011).

Побољшање профитабилности поступка производње ксантана такође може бити остварено и побољшањем квалитета добијеног биополимера, повећањем његове молекулске масе, као и садржаја ацетата и пирувата у молекулу (Garcia-Ochoa et al., 2000a). На овај начин би се повећала цена ксантана на тржишту производа прехранбене, козметичке и фармацеутске индустрије.

У складу са горенаведеним закључцима, добијеним у овом делу истраживања, даља истраживања су спроведена са циљем унапређења процеса производње ксантана применом ефлуената из различитих грана прехранбене индустрије.

5.3. БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА НА ЕФЛУЕНТИМА РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

Резултати добијени испитивањем производње ксантана на ефлуенту из производње јестивог уља као основи култивационог медијума су показали да постоји велики потенцијал његове примене као сировине у биотехнолошкој производњи ксантана, међутим резултати показатеља успешности овог биопроцеса и анализа симулационог модела постројења за производњу ксантана на бази овог ефлуента су показали да је неопходно даље унапређење процеса производње како би се побољшала његова ефикасност.

Управо из горенаведених разлога спроведена су даља истраживања која су обухватила испитивање могућности примене отпадних ефлуената различитих грана прехранбене индустрије као основе култивационог медијума у производњи биополимера ксантана. Примењени ефлуенти, који воде порекло из различитих делова процеса 17 различитих фабрика чија делатност припада различитим гранама прехранбене индустрије и индустрије пића, су окарактерисани у погледу уобичајених и параметара од значаја за биотехнолошку производњу, а потом је испитана могућност њихове примене као основе култивационог медијума у биотехнолошкој производњи ксантана одређивањем показатеља успешности биосинтезе и потврђивањем одсуства инхибиторних супстанци за метаболизам примењеног производног микроорганизма. Поред тога, изведена је оптимизација састава најзначајнијих нутријената код полусинтетичке подлоге са глукозом, применом методе жељене функције, а са циљем добијања максимално могуће количине жељеног производа, задовољавајућег квалитета уз заостајање минималних количина нутријената. Следећа фаза истраживања је обухватила проверу применљивости добијених оптималних вредности одабраних параметара у увећаним размерама применом полусинтетичке подлоге са глукозом, као и 5 отпадних ефлуената као основе култивационог медијума за биосинтезу ксантана, а који су одабрани на основу квалитета и квантитета жељеног производа. Том приликом одређена је кинетика раста биомасе, кинетика потрошње извора угљеника, као и кинетика настајања производа и добијени кинетички модели су употребљени за симулацију биопроцеса производње ксантана у сегменту биореакције. На основу резултата добијеног симулационог модела изведена је анализа биопроцеса производње ксантана на ефлуентима различитих грана прехранбене индустрије.

5.3.1. АНАЛИЗА ЕФЛУЕНАТА ИЗ РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

Анализа доступних података о карактеристикама отпадних вода за сваку од грана прехранбене индустрије (табела 3.2) показује да се вредности најзначајнијих параметара којима се процењује квалитет ових отпадних токова крећу у широким границама што првенствено зависи од примењене технологије у конкретној производњи, али и сировине која се прерађује. Сировине које се користе у различитим гранама прехранбене индустрије и индустрије пића су углавном пољопривредни производи чији састав варира од сезоне до сезоне, а веома зависи и од локалитета и врсте земљишта на којем се култура гаји. У табели 5.16. приказани су резултати анализе примењених отпадних ефлуената у погледу најзначајнијих показатеља квалитета отпадних вода и показатеља који су од значаја за биотехнолошку производњу.

Табела 5.16. Карактеристике отпадних вода различитих грана прехранбене индустрије са територије АП Војводине

Грана прехранбене индустрије из које потиче отпадна вода	pH [1]	ХПК [mg/l]	БПК [mg/l]	Редукујуће материје [mg/l]	N _{ук} [mg/l]	N _{асим} [mg/l]	P _{ук} [mg/l]	Ca [mg/l]	Na [mg/l]	Mg [mg/l]	K [mg/l]	Суспендоване честице [mg/l]
производња шећера	8,8	12460	3600	25,7	189	53,2	9,7	157	25	61	71	1360
производња кекса	5,7	792	420	224,1	105	56	2,2	36	213	18	52	56
производња чоколаде	10,2	9562	6984	568,2	194	98	48	41	80	21	34	266
производња замрзнутог воћа	8,1	695	412	120,1	340	211,9	72	21	32	25	51	69
производња замрзнутог поврћа	7,5	396	99	4,7	212	55	1,8	25	34	27	33	128
прерада меса	8,1	163100	42000	3092,23	1869	182	10,2	118	123	136	156	174872
прерада млека	5,2	2770	550	12,5	98	5,6	27	76	31	151	167	2272
производња киселомлечних производа	3,1	170000	47000	3171,4	4501	243,6	143,4	31	560	24	111	90228
производња скроба	4,1	14500	9200	3271,2	546	294	22	41	11	34	52	1180
производња сока од јабуке	6,1	5871	2452	560,3	93	16,1	4,2	22	211	22	21	145
производња сока од брескве	6,4	6235	3876	825,3	321	174,2	3,6	29	174	25	17	325
производња пива	5,8	7840	2300	744,5	247	84	22,4	112	12	42	180	112
производња вина	6,4	4215	2215	4104,4	238	71	35	98	9,2	36	215	669
производња алкохола на меласи	4,2	1100000	96000	18366,5	17220	2604	155,9	109	741	163	1565	333256
производња алкохола из кукуруза	4,6	54880	31000	5403,6	3108	473,2	113,85	81	322	96	365	4696
производња алкохола из скробних сировина	3,9	81200	24000	7175,3	2924,46	588	119,5	95	632	47	852	22504
производња колагених омотача	2,1	2400	540	390	145	19,6	31,5	35	712,6	56	117	3556

Велике разлике у карактеристикама анализираних отпадних вода (табела 5.16) и литературно доступних вредности за отпадне воде различитих грана прехранбене индустрије (табела 2.2) вероватно потичу од разлика у примењеној технологији производње, употребљених сировина, старости производних постројења, начина и примењених средстава за чишћење, количине генерисане отпадне воде, и др. (Rosenwinkel et al., 2005). Поред тога, пошто специфичности прехранбене индустрије и индустрије пића исходе управо из узгајаних пољопривредних култура, јасно је да се карактеристике отпадних вода насталих на наведеном локалитету значајно разликују у односу на отпадне токове са других територија па чак и приликом производње сличних производа.

На основу добијених резултата може се видети да се вредности рН анализираних отпадних вода крећу у широким границама, од изразито киселих (отпадна вода из производње колагених омотача и киселомлечних производа), до изразито базних (отпадна вода из производње чоколаде). Вредност рН је мера киселости отпадних вода и њене вредности варирају у зависности од порекла отпадне воде, услова околине и трајања складиштења (Liu, 2007).

Вредности ХПК и БПК се примењују за процену садржаја органских материја у отпадним токовима, које се индиректно одређују на основу вредности о потрошњи кисеоника (Rosenwinkel et al., 2005). Добијени резултати показују да се вредности ових параметара значајно разликују код примењених отпадних ефлуената и да су вредности ХПК увек веће у односу на вредности БПК, што је и очекивано (Liu, 2007). Нарочито високе ХПК и БПК вредности су добијене анализом отпадних вода из прераде меса (136100 mg/l и 42000 mg/l), производње киселомлечних производа (170000 mg/l и 47000 mg/l) и производње алкохола на меласи (1100000 mg/l и 96000 mg/l). Ови резултати су и очекивани с обзиром да је органска материја у отпадним водама најчешће присутна као смеша протеина, угљених хидрата и масти и уља (Heroniemi and Lassi, 2012). Поред тога, једињења као што су различити алкохоли присутни у отпадним водама повећавају њихову вредност (Rodriguez-Caballero et al., 2012).

За потребе извођења биотехнолошког процеса производње ксантана применом отпадних вода различитих грана прехранбене индустрије, од великог је значаја одређивање садржаја редукујућих материја. На основу ове вредности се може проценити количина шећера односно извора угљеника у анализираној отпадној води. Редукујуће материје су одређене уобичајеном методом при чему су као калибрационе криве, за сваку појединачну отпадну воду, примењене криве добијене одређивањем апсорбације стандардних раствора одговарајућег шећера који се највећим уделом налази у тој отпадној води. На основу добијених резултата, који се крећу у границама од 4,7 mg/l за отпадну воду из производње замрзнутог поврћа до 18366,5 mg/l за отпадну воду из производње алкохола на меласи, може се одредити количина извора угљеника потребног за формулисање одговарајућих медијума, а на бази сваке појединачне отпадне воде.

Азот и фосфор су нутријенти неопходни за основни метаболизам свих микроорганизама (Heroniemi and Lassi, 2012). С обзиром да интензивно утичу на њихов раст могу довести до еутрофикације водених токова и неопходно их је уклонити из отпадних ефлуената пре испуштања (Rosenwinkel et al., 2005). С друге стране, с обзиром да су неопходни за биотехнолошке процесе отпадне воде представљају њихов одличан извор. У анализираним отпадним водама, вредности укупног азота се налазе у опсегу од 93 mg/l у отпадној води из производње сока од јабуке до 17220 mg/l у отпадној води из производње алкохола на меласи, док су вредности асимилабилног азота, односно амонијачног и α -амино азота који је микроорганизмима лако доступан, ниже и крећу се у опсегу 5,6 mg/l у отпадној води из прераде

млека до 2604 mg/l у отпадној води из производње алкохола на меласи. Садржај фосфора је најнижи у отпадној води из производње замрзнутог поврћа, где износи 1,8 mg/l, а највећи у отпадној води из производње алкохола на меласи где износи 155,9 mg/l.

Садржај минералних материја, као што су калцијум, натријум, магнезијум и калијум, се уобичајено не одређује приликом карактеризације отпадних вода, међутим, када се ови ефлуенти разматрају као потенцијалне сировине за биотехнолошку производњу ови показатељи су веома значајни, с обзиром да је за функционисање метаболизма сваког производног микроорганизама од великог значаја присуство свих микро- и макронутријената (Пејин, 2003). Резултати одређивања минералних материја показују да се вредности калцијума крећу између 21 mg/l и 157 mg/l, натријума 9,2 mg/l и 712,6 mg/l, магнезијума 18 mg/l и 163 mg/l и калијума 18 mg/l и 1565 mg/l.

Чврсте материје у отпадним водама се јављају као растворљиве и суспендоване материје, при чему између 40 и 65% материја у отпадним водама представљају суспендоване материје (Alturkmani, 2013). Оне су непожељне јер се у рецепијентима, у које се излива отпадна вода, могу таложити на дно или плутати по површини при чему нарушавају еколошку равнотежу прихватног тока (Liu, 2007). Резултати анализираних отпадних вода показују да се вредности садржаја суспендованих материја креће у широком опсегу, од веома ниских (56 mg/l код отпадне воде из производње кекса и 69 mg/l код отпадне воде из производње замрзнутог воћа) до веома високих (90228 mg/l код отпадне воде из производње киселомлечних производа, 174876 mg/l код отпадне воде из производње меса и 333256 mg/l код отпадне воде из производње алкохола на меласи). Суспендоване материје у култивационој течности могу да наруше осмотску равнотежу и да изазову осмотски шок код производних микроорганизама што последично омета њихову метаболичку активност. За врсте рода *Xanthomonas* нема података о количини суспендованих материја које ће довести до описаног ефекта па ће екпериментални подаци дати недвосмислен одговор.

На основу добијених резултата анализе отпадних вода различитих грана прехранбене индустрије АП Војводине (табела 5.16), може се видети да постоје значајне разлике у вредностима свих показатеља њиховог квалитета. Међутим, уколико се успешном реализацијом биопроцеса експериментално докаже да ове отпадне воде не садрже супстанце са инхибиторним утицајем на биосинтезу жељеног производа, све испитане отпадне воде ће се применити као извор минералних материја и као процесна вода. Отпадне воде из производње кекса, из прераде млека, из производње сока од јабуке и из производње колагених омотача морају се у потпуности обогатити ферментабилним изворима угљеника, азота и фосфора, односно могу се применити као замена за процесну воду и неопходне минералне материје. Добијени резултати показују да се отпадне воде из производње шећера, из производње и прераде замрзнутог поврћа, из прераде меса, из производње скроба, из производње сока од брескве, из производње пива и из производње вина могу користити као извор азота, микроелемената и као процесна вода, док је одговарајућу количину извора угљеника и фосфора неопходно додати за неометано извођење биопроцеса. Отпадне воде из производње чоколаде, из производње и прераде замрзнутог воћа, из производње киселомлечних производа, као и отпадне воде добијене након производње алкохола применом кукурузних и скробних сировина се могу применити као извори азота, фосфора, микроелемената и свакако као процесна вода, уз додаток одговарајућег извора угљеника. Анализирана отпадна вода која садржи све нутријенте, у потребној количини, неопходне за формулисање медијума за биосинтезу ксантана је отпадна вода из производње алкохола на меласи.

5.3.2. БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНИМ МЕДИЈУМИМА СА ЕФЛУЕНТИМА РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

Биосинтеза ксантана применом референтног соја *X. campestris* ATCC 13951 на култивационим медијумима који као основу садржи ефлуенте из 17 различитих грана прехранбене индустрије је изведена са циљем утврђивања могућности примене ових отпадних ефлуената у наведеном биотехнолошком процесу и у дефинисаним експерименталним условима. На основу података о саставу отпадних ефлуената (табела 5.16) и литературних података о нутритивним потребама производног микроорганизма, формулисани су култивациони медијуми, било разблаживањем примењене отпадне воде или њеним обогаћивањем одговарајућим нутријентима, а у складу са саставом култивационог медијума дефинисаним у поглављу 4.2. Поред праћења динамике потрошње основних макронутријената током биосинтезе, могућност биосинтезе је потврђивана одређивањем реолошких карактеристика култивационих течности, док су вредности количине добијеног производа на крају биопроцеса, као и вредности конверзије основних макронутријената и вредност конверзије извора угљеника у ксантан употребљене за процењивање успешности овог биотехнолошког процеса.

5.3.2.1. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

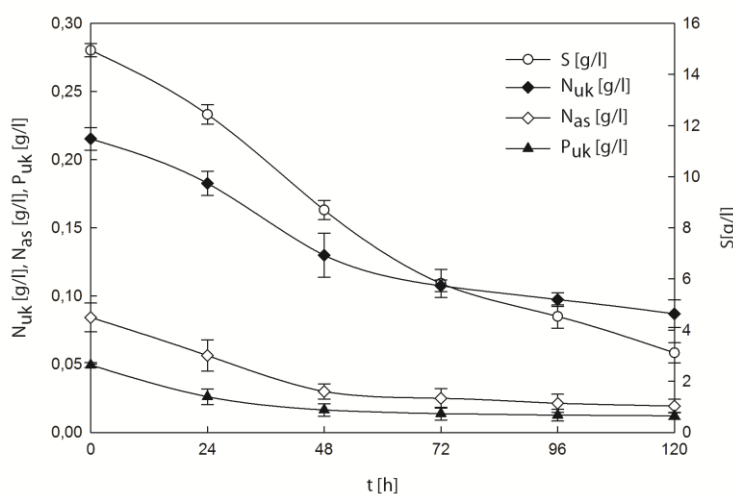
На нашем поднебљу шећер се производи из шећерне репе, кампањском односно сезонском производњом која се одвија од септембра до половине децембра. Иако овакве отпадне воде нису доступне током целе године, обим производње односно степен развоја индустрије шећера у АП Војводини, па самим тим и количине насталих отпадних токова се не могу занемарити, услед чега је од великог значаја изналажење ефикасних начина пречишћавања ових отпадних ефлуената или уколико постоји могућност, њихова примена као сировине у биотехнолошкој производњи. Према литературним подацима најважније компоненте отпадних вода које настају при производњи шећера су органска једињења из шећерне репе и шећера, док су количине азота и фосфора релативно ниске. Поред тога, у случајевима када се кречно млеко додаје у оборинске воде и приликом пречишћавања екстракционог сока отпадна вода има повећану концентрацију калцијума (Rosenwinkel et al., 2005; Шушић и сар., 1994). Литература наводи да се отпадне воде добијене током производње шећера могу применити као основа култивационог медијума у биотехнолошкој производњи водоника применом производног микроорганизма *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 (Yetis et al., 2000).

У табели 5.17. приказане су вредности реолошких параметара и привидан вискозитет култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње шећера током биосинтезе ксантана. Реолошке карактеристике и израчунати реолошки параметри показују да је дошло до повећања привидног вискозитета добијених култивационих течности (са вредности 11,95 mPa·s на вредност од 81,73 mPa·s), као и вредности коефицијента конзистенције истих (са вредности 0,1275 Pa·sⁿ на вредност 3,1619 Pa·sⁿ) што недвосмислено указује на повећање количине биополимера. Поред тога, псеудопластични карактер добијених култивационих течности који представља потврду биосинтезе ксантана је утврђен на основу добијених вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,5249 на вредност 0,2663).

Промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера је приказана на слици 5.15.

Табела 5.17. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње шећера током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1275	0,5249	11,95 ± 0,54
72	0,2385	0,5147	21,25 ± 1,32
96	1,0719	0,3855	50,18 ± 2,65
120	3,1619	0,2663	81,73 ± 3,35



Слика 5.16. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

Из резултата приказаних на слици 5.16, у току првих 72 часа уочава се уједначено смањење садржаја извора угљеника са вредности од око 14,94 g/l на вредност око 5,83 g/l, а затим се смањење наставља нешто блажим интензитетом до крајње вредности од око 3,11 g/l колико износи у 120-том часу. Што се тиче садржаја укупног и асимилабилног азота, чије почетне вредности износе око 0,215 g/l и 0,084 g/l, уочава се интензивно опадање њихових вредности у току 48 часова биосинтезе, након чега се њихов садржај смањује значајно мањим интензитетом до краја биопроцеса. Промена садржаја фосфора показује исти тренд, интензивно опада до 48-ог часа биосинтезе са вредности од око 0,049 g/l на вредност 0,016 g/l, а потом има готово константну вредност до краја биосинтезе ксантана када износи 0,012 g/l.

На основу добијених резултата може се тврдити да се отпадна вода из производње шећера може применити као основа култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана.

5.3.2.2. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из кондиторске индустрије

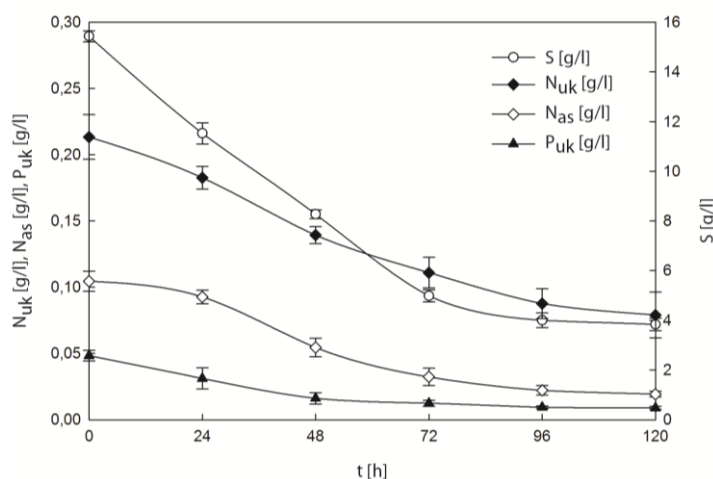
Отпадне воде кондиторске индустрије представљају велике загађиваче животне средине и највећи део загађења ових отпадних вода потиче од биоразградивих органских материја, које се карактеришу високим БПК и ХПК вредностима (Qasim and Mane, 2013, Ammar, 2014). Разлике у саставу и карактеристикама отпадних ефлуената које генерише ова грана прехранбене индустрије у великој мери зависе од употребљених сировина и добијених производа, а узимајући у обзир обим производње, као и чињеницу да се ове отпадне воде не примењују као сировина у неком другом технолошком поступку, од великог је значаја испитивање могућности њихове примене за биотехнолошку производњу ксантана. Управо из овог разлога експериментално је испитана могућност примене отпадних вода из производње кекса и чоколаде, које потичу из две различите фабрике са територије АП Војводине.

Реолошке карактеристике култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње кекса и израчунати реолошки параметри приказани у табели 5.18. указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 28,65 mPa·s на вредност од 83,22 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,4657 Pa·s⁻ⁿ на вредност 2,2908 Pa·s⁻ⁿ) култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање количине жељеног биополимера. Такође, несумњива потврда биосинтезе ксантана представљају и вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током процеса са вредности 0,4403 на вредност 0,3346.

На слици 5.17. приказана је промена садржаја најзначајнијих нутријената током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње кекса.

Табела 5.18. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње кекса током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,4657	0,4403	28,65 ± 0,95
72	0,8855	0,3780	39,93 ± 1,36
96	1,0648	0,3673	45,53 ± 1,45
120	2,2908	0,3346	83,22 ± 1,53



Слика 5.17. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

Из добијених резултата, приказаних на слици 5.17, уочава се интензиван пад концентрације извора угљеника од почетних око 15,43 g/l до 4,99 g/l у току првих 72 часа. У даљем току култивације уочава се минималано смањење до 96-ог часа, а затим се постиже готово константна вредност која износи око 3,84 g/l до краја процеса. Количина укупног азота константно опада до 96 часа, након чега стагнира и има крајњу вредност од око 0,079 g/l. Крива зависности концентрација асимилабилног азота од времена трајања процеса има нешто другачији тренд и вредност иницијалне концентрације је готово непромењена у прва 24 часа и износи око 0,105 g/l, након чега се уочава изражено опадање вредности у наредна 72 часа, а у последња 24 часа биосинтезе готово да нема промене, те крајња концентрација износи око 0,019 g/l.

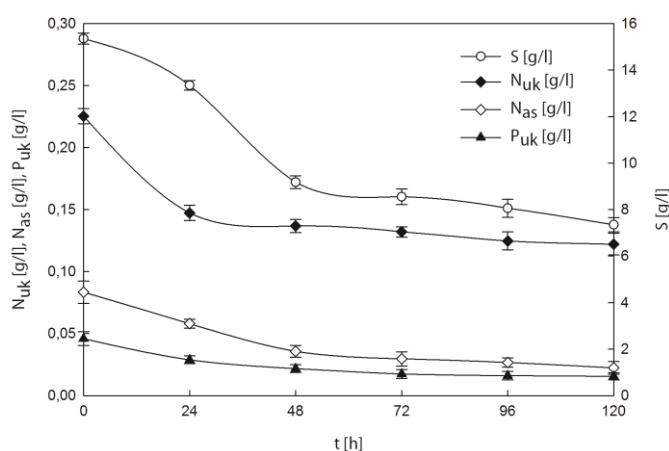
Приказани резултати показују да се на почетку култивације фосфор троши у највећој мери. У току првих 48 часова садржај овог нутријента опада са вредности од око 0,048 g/l до 0,016 g/l, након чега се интензитет опадања смањује, те крајњи садржај износи око 0,009 g/l.

Резултати реолошких параметара и привидан вискозитет медијума који као основу садржи отпадну воду из производње чоколаде током биосинтезе ксантана су приказани у табели 5.19. Израчунати реолошки параметри указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 11,66 mPa·s на вредност од 44,47 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,0996 Pa·s⁻ⁿ на вредност 0,9680 Pa·s⁻ⁿ) добијених култивационих течности што указује на повећање количине жељеног биополимера. Такође, вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,5695 на вредност 0,3817), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности односно потврђују биосинтезу ксантана.

На слици 5.18. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње чоколаде.

Табела 5.19. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње чоколаде током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,0996	0,5695	11,66 ± 1,54
72	0,3024	0,4675	21,30 ± 0,65
96	0,7051	0,3977	35,08 ± 0,74
120	0,9680	0,3817	44,47 ± 1,36



Слика 5.18. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње чоколаде

Резултати приказани на слици 5.18. показују смањење садржаја извора угљеника у првих 48 часова са 15,35 g/l на 9,18 g/l, након чега се садржај извора угљеника константно смањивао уједначеним интензитетом до крајње вредност од око 7,35 g/l у 120-том часу. Посматрањем укупног и асимилабилног азота уочава се да је њихова потрошња најинтензивнија на почетку процеса, односно у току прва 24 часа за укупни азот и то са вредности 0,225 g/l на 0,147 g/l, односно у току првих 48 часова за асимилабилни азот са вредности од 0,083 g/l на 0,036 g/l након чега се садржај ових нутријената у подлози значајно не мења и достује крајњу вредност од око 0,122 g/l и 0,022 g/l, редом. Промена садржаја фосфора је изражена током првих 48 часова биосинтезе при чему опада са 0,046 g/l до 0,022 g/l, након чега се интензитет опадања смањује, те крајњи садржај износи око 0,016 g/l.

Добијени резултати привидног вискозитета и коефицијента конзистенције култивационих течности добијених током биосинтезе ксантана применом медијума који као основу садржи отпадну воду из производње кекса имају веће вредности у поређењу са истим показатељима добијеним приликом биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње чоколаде. С обзиром да ове вредности зависе од квантитета и квалитета произведеног биополимера, на основу добијених резултата може се закључити да је већа количина ксантана добијена применом отпадне воде из производње кекса као основе култивационог медијума приликом биосинтезе ксантана.

5.3.2.3. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из прераде воћа и поврћа

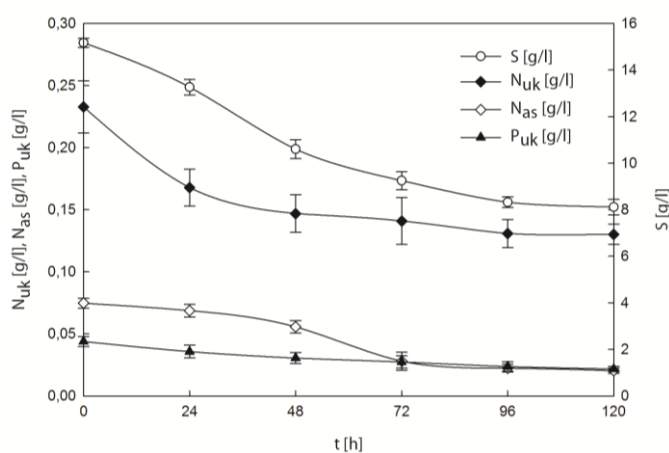
Постројења за обраду воћа и поврћа су водећи потрошачи воде и генератори отпадних ефлуената јер се у свим фазама прераде хране, сирове намирнице морају одржавати чисте и здраве, уз максималне санитарне услове. Постоји неколико заједничких процеса унутар обраде воћа и поврћа који стварају отпадне воде, као што су: конзервисање, прање и испирање, сортирање, мешање и кување, хидротранспорт сировина, гуљење коре, сушење/дехидратација,

пасирање и цеђење сока, бланширање и чишћење. Неке од ових операција генеришу веће количине воде, а неке мање. У већини случајева ове отпадне воде су се показале као биоразградиве и најчешће садрже угљене хидрате, пектине, витамине, скробове и остале компоненте ћелијских зидова који се деградирају током прераде (Liu, 2007). С обзиром да се у индустрији воћа и поврћа примењује велики број различитих процеса, квалитет и количина генерисаних ефлуената варирају у зависности од примењених процеса као и сезоне, услед чега је неопходно извршити њихову карактеризацију и проценити могућност примене у биотехнолошкој производњи.

У табели 5.20. приказани су реолошки параметри и привидан вискозитет медијума који као основу садржи ефлуент из производње и прераде замрзнутог воћа током биосинтезе ксантана.

Табела 5.20. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње замрзнутог воћа током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,3503	0,4580	23,53 ± 0,22
72	0,4277	0,4509	27,73 ± 0,65
96	0,5606	0,4379	34,07 ± 2,32
120	1,2750	0,3411	47,84 ± 0,47



Слика 5.19. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње замрзнутог воћа

Реолошке карактеристике култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње замрзнутог воћа и добијене вредности реолошких параметара указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 23,53 mPa·s на вредност од 47,84 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,3503 Pa·sⁿ на вредност 1,2750 Pa·sⁿ) култивационих течности током биосинтезе што указује на промене реологије система услед биосинтезе ксантана.

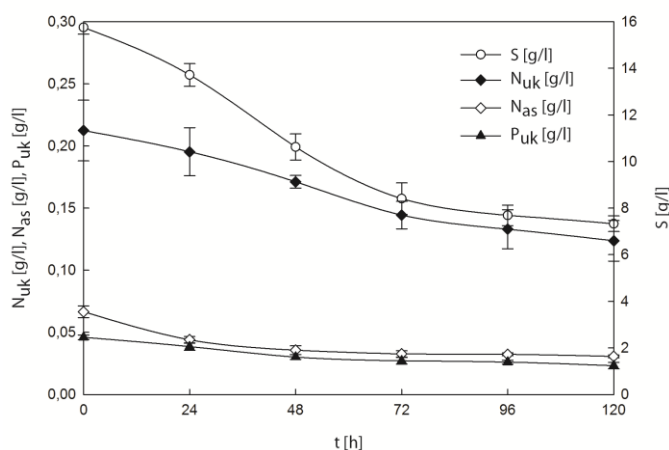
Псеудопластични карактер анализираних култивационих течности је потврђен на основу добијених вредности индекса тока, које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса производње ксантана (са 0,4580 на вредност 0,3411), што је потврда биосинтезе ксантана.

Промена садржаја најзначајнијих нутријената током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње и прераде замрзнутог воћа је приказана на слици 5.19. Садржај извора угљеника се константно смањује током култивације, са вредности од око 15,17 g/l до 8,11 g/l. Промена укупног азота показује интензивано смањење у прва 24 часа, са вредности од око 0,233 g/l на 0,168 g/l, након чега се уочава благо смањивање до коначне концентрације која износи око 0,13 g/l. Садржај асимилабилног азота има незнатну промену вредности у првих 48 часова биосинтезе ксантана, са иницијалне која износи 0,075 g/l до 0,056 g/l, а затим интензивније смањење до концентрације око 0,028 g/l у 72-ом часу биосинтезе. Након 72-ог часа, садржај асимилабилног азота се благо смањује до краја процеса и достиже вредност од око 0,02 g/l. Садржај фосфора се током процеса константно смањивао, са иницијалне вредности од око 0,044 g/l на вредност од око 0,022 g/l на крају биосинтезе.

Вредности реолошких параметара и привидан вискозитет култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње и прераде замрзнутог поврћа током биосинтезе ксантана су приказани у табели 5.21. Добијени резултати указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 15,56 mPa·s, на вредност од 36,70 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,1737 Pa·sⁿ, на вредност 0,5374 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе односно повећање количине произведеног ксантана. Такође, вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,5157, на вредност 0,4613), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности што је несумњива потврда биосинтезе ксантана.

Табела 5.21. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње замрзнутог поврћа током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1737	0,5157	15,56 ± 1,05
72	0,3037	0,4982	24,93 ± 2,32
96	0,3593	0,4858	27,72 ± 2,65
120	0,5374	0,4613	36,70 ± 1,74



Слика 5.20. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње замрзнутог поврћа

На слици 5.20. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње и прераде замрзнутог поврћа. Промена, односно смањивање количине извора угљеника током свих 120 часова трајања процеса је јасно уочљиво. Почетна концентрација износила је 15,75 g/l, а крајња око 7,33 g/l. Код промене количина укупног и асимилабилног азота, уочава се константно смањење са почетних количина које су износи око 0,212 g/l и 0,067 g/l, до количина на крају биосинтезе, које су износиле око 0,124 g/l и 0,031 g/l, редоследом. Количина фосфора такође опада у првих 48 часова, са вредности од око 0,046 g/l на 0,03 g/l, након чега њена вредност остаје константна до краја биосинтезе када износи око 0,023 g/l.

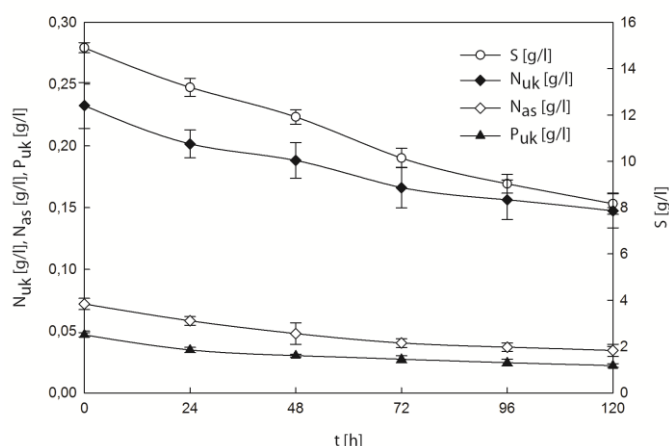
5.3.2.4. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из меснопрерађивачке индустрије

Меснопрерађивачка индустрија је један од највећих произвођача органског отпада у сектору прехранбене индустрије уопште. Отпадне материје из индустрије прераде меса се могу поделити на чврст отпад, загађиваче воде и загађиваче ваздуха. Отпадне воде месне индустрије су веома штетне за околину и њихово испуштање изазива деоксигенацију река и контаминацију подземних вода и од великог је значаја изналажење ефикасних начина решавања проблема које ове отпадне воде изазивају. Такође, ове отпадне воде садрже велике количине суспендованих материја, укључујући комаде масти, меса, длаке, перје, шљунак и несварене комаде хране (Rosenwinkel et al., 2005).

На одабир отпадне воде из меснопрерађивачке индустрије као потенцијалне сировине у биотехнолошкој производњи, од великог значаја је чињеница да су капацитети ове индустријске гране и количине генерисаних отпадних ефлуената, на територији АП Војводине, веома значајне и доступне током целе године, а не постоје алтернативне примене ове отпадне воде као сировине за добијање производа са тржишном вредношћу. Међутим, тек након експерименталне потврде могућности примене отпадне воде из производње и прераде као основе ферментационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана, са сигурношћу се може тврдити да ове отпадне воде не садрже инхибиторне супстанце.

Табела 5.22. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из меснопрерађивачке индустрије током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1122	0,5186	10,19 ± 1,21
72	0,2269	0,5059	19,35 ± 1,65
96	0,4371	0,4177	24,02 ± 1,32
120	0,5630	0,3950	27,63 ± 0,87



Слика 5.21. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из меснопрерађивачке индустрије

На слици 5.21. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на ферментационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из меснопрерађивачке индустрије. Резултати показују да се садржај извора угљеника током биосинтезе смањило са око 14,9 g/l, колико је износио непосредно након инокулације, на вредност од око 8,17 g/l, након 120 часова култивације. У току биопроцеса производње ксантана садржај укупног азота се константно смањује са иницијалне вредности која износи око 0,233 g/l до вредности од 0,147 g/l колико износи у 120-ом часу биосинтезе. Количина асимилабилног азота се интензивније смањује у првих 72 часа биосинтезе са почетне вредности од око 0,072 g/l, на вредност од 0,40 g/l, након чега долази до веома благог опадања до краја биосинтезе, када садржај асимилабилног азота има вредност 0,034 g/l. Иницијална вредност фосфора у ферментационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из меснопрерађивачке индустрије износи око 0,047 g/l и интензивније се смањује током првих 24 часа биосинтезе, након чега долази до благог али константног опадања и постизања крајње вредности од 0,022 g/l.

У табели 5.22. приказани су реолошки параметри и привидан вискозитет култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из меснопрерађивачке индустрије током биосинтезе ксантана. Добијени резултати показују да је током биосинтезе ксантана дошло до повећања привидног вискозитета (са вредности 10,19 mPa·s на вредност од 27,63 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности од 0,1122 Pa·sⁿ на вредност 0,5630 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности односно до повећања количине произведеног биополимера ксантана. Такође, вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током биопроцеса (са вредности 0,5186 на вредност 0,3950), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности што је недвосмислено потврда биосинтезе ксантана.

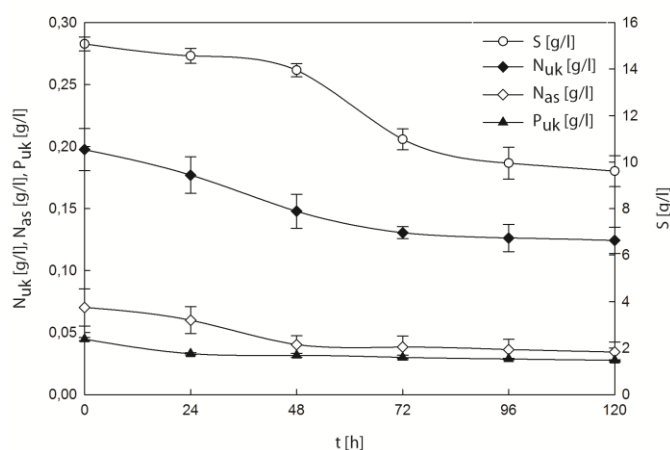
5.3.2.5. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње и прераде млека

Отпадне воде индустрије млека се по својим карактеристикама битно разликују од отпадних вода других грана прехранбене индустрије и садрже велику количину растворених органских материја, углавном протеина, лактозе и масти. Производња млека и млечних производа обухвата више погонских јединица за различите производе, од којих сваки даје своју отпадну воду, што проблем отпадних вода индустрије млека чини посебно комплексним. Из погона за пастеризацију и сирење чистог млека добија се само вода од прања, а постоје периоди када је она веома кисела или веома базна због употребе азотне киселине или соде за прање. Погони за производњу сира и казеина дају и сурутку која садржи доста лактозе, а мало протеина (Стефановић и сар., 2008).

Обим производње односно развијеност индустрије млека и млечних производа у АП Војводини, као и количине веома оптерећених отпадних ефлуената које оне генеришу се не могу занемарити услед чега је од великог значаја изналажење ефикасних начина пречишћавања ових отпадних ефлуената или уколико постоји могућност, њихова примена као сировине у биотехнолошкој производњи. Управо из овог разлога експериментално је испитана могућност примене отпаде воде из прераде млека и отпадне воде из производње киселомлечних производа, које потичу из две различите фабрике са територије АП Војводине.

Табела 5.23. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње и прераде млека током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,0623	0,6301	9,87 ± 0,86
72	0,1000	0,5710	11,80 ± 1,32
96	0,1284	0,5522	13,79 ± 1,45
120	0,1730	0,5427	17,72 ± 1,18



Слика 5.22. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње и прераде млека

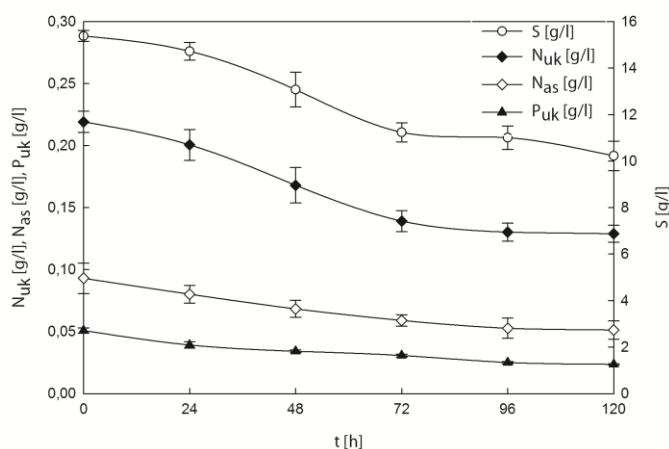
Реолошке карактеристике култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње и прераде млека и израчунати реолошки параметри приказани у табели 5.23. указују на повећање привидног вискозитета култивационих течности (са вредности која износи 9,87 mPa·s на вредност од 17,72 mPa·s) и коефицијента конзистенције истих (са вредности 0,0623 Pa·sⁿ на вредност 0,1730 Pa·sⁿ) што указује на повећање количине жељеног биополимера који утиче на промену реолошких особина посматраног система. Поред тога, добијене вредности индекса тока, односно њихова промена (са вредности 0,6301 на вредност 0,5427), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности што недвосмислено указује да је дошло до биосинтезе ксантана, у примењеним експерименталним условима.

Промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на ферментационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње и прераде млека приказана је на слици 5.22. На основу добијених резултата може се приметити да се у првих 48 часова концентрација извора угљеника благо смањила са вредности 15,08 g/l до 13,95 g/l. Такође, уочава се да је потрошња угљеника најинтензивнија између 48-ог и 72-ог часа када је утрошено 2,97 g/l извора угљеника. Након 72-ог часа биосинтезе садржај угљеника наставља да опада слабијим интензитетом и достиже вредност од 9,61 g/l у 120-ом часу биопроцеса. Количина укупног азота, чија је иницијална вредност 0,198 g/l се интензивно смањивала до 72 часа и вредности од 0,131 g/l, након чега до краја процеса се уочава веома благо опадање и постизање вредности од око 0,124 g/l. Количина асимилабилног азота се константно смањивала током процеса биосинтезе ксантана, са вредности од око 0,07 g/l до вредности од око 0,034 g/l у 120-ом часу биосинтезе. Садржај фосфора је након инокулације износио око 0,045 g/l, након чега се интензивно смањује током првих 24 часа и вредности од 0,033 g/l, а потом има готово константну вредност до краја процеса када износи око 0,028 g/l.

Реолошки параметри и реолошке карактеристике култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње киселомлечних производа приказани су у табели 5.24. и указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 11,22 mPa·s, на вредност од 19,22 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,1019 Pa·sⁿ, на вредност 0,1940 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе што показује да је дошло до биосинтезе ксантана. Добијене вредности индекса (чија вредност се смањује са 0,5571, на 0,5360) указују на псеудопластични карактер медијума што додатно потврђује могућност биосинтезе.

Табела 5.24. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње киселомлечних производа током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1019	0,5571	11,22 ± 0,45
72	0,1204	0,5499	12,79 ± 0,62
96	0,1358	0,5449	14,07 ± 1,25
120	0,1940	0,5360	19,22 ± 0,98



Слика 5.23. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње киселомлечних производа

Највеће промене садржаја извора угљеника (слика 5.23) забележене су између 24-ог и 72-ог часа, када се његова количина смањила са вредности од 15,38 g/l на 11,23 g/l, а до краја биопроцеса уочава се благо смањење његове вредности које у 120-ом часу износи око 10,22 g/l. Садржај укупног азота се уједначено смањује до 72 часа, са иницијалне вредности која износи око 0,219 g/l до 0,139 g/l, након чега његова вредност до краја процеса остаје готово непромењена и у 120-ом часу износи 0,129 g/l. Садржај асимилабилног азота се смањује са вредности 0,093 g/l на 0,051 g/l током биосинтезе ксантана. Највеће смањење количине фосфора уочава се у прва 24 часа биосинтезе, од почетне вредности која износи 0,051 g/l на 0,039 g/l, након чега његова количина наставља да се смањује до краја биосинтезе и вредности од 0,024 g/l.

5.3.2.6. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из млинарске индустрије

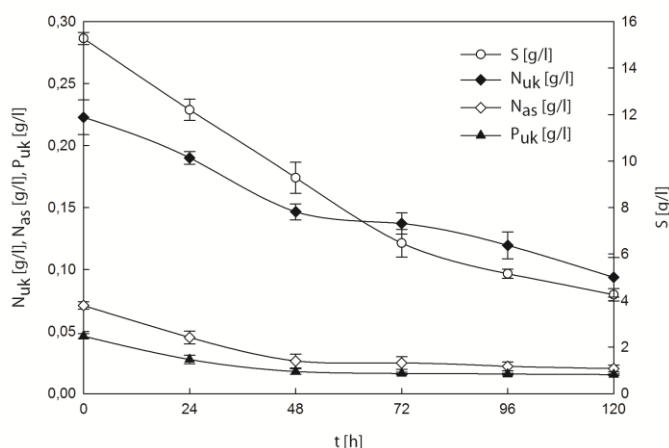
Скроб се производи од кромпира кукуруза, и пшенице и у зависности од полазне сировине, фракције отпадне воде, њихове количине и оптерећења значајно варирају. Отпадна вода из производње скроба претежно садржи велику количину органских материја и нерастворене органске материје су у великој мери угљени хидрати и протеини (Rosenwinkel et al., 2005). Управо из овог разлога, отпадна вода која се генерише приликом производње скроба представља сировину која је погодна за биотехнолошку производњу различитих производа, као што су фунгални протеини (Jin et al., 1999) и биоинсектициди (Chang et al., 2008). У литератури се могу пронаћи подаци који говоре о могућности производње ксантана на култивационом медијуму који као једини извор угљеника садржи сирови касава скроб (Kerdsup et al., 2011). Разлике у саставу и карактеристикама отпадних ефлуената које генерише ова грана прехранбене индустрије у великој мери зависе од употребљених сировина, а узимајући у обзир обим производње и количине генерисаних отпадних токова, као и чињеницу да се ове отпадне воде не примењују као сировина у неком другом технолошком поступку, од великог је значаја испитивање могућности њихове примене за биотехнолошку производњу ксантана.

У табели 5.25. приказане су вредности реолошких параметара и привидан вискозитет ферментационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње скроба током биосинтезе ксантана.

Табела 5.25. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње скроба током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1620	0,5237	15,10 ± 0,85
72	0,3049	0,4688	21,62 ± 0,45
96	1,1797	0,3678	50,56 ± 1,36
120	1,7936	0,3472	69,38 ± 2,43

Добијени резултати показују да је дошло до повећања привидног вискозитета (са вредности 15,10 mPa·s, на вредност од 69,38 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,1620 Pa·sⁿ, на вредност 1,7936 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање количине жељеног производа. Поред тога, псеудопластични карактер добијених култивационих течности је потврђен на основу добијених вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,5237, на вредност 0,3472).



Слика 5.24. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње скроба

На слици 5.24. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње скроба.

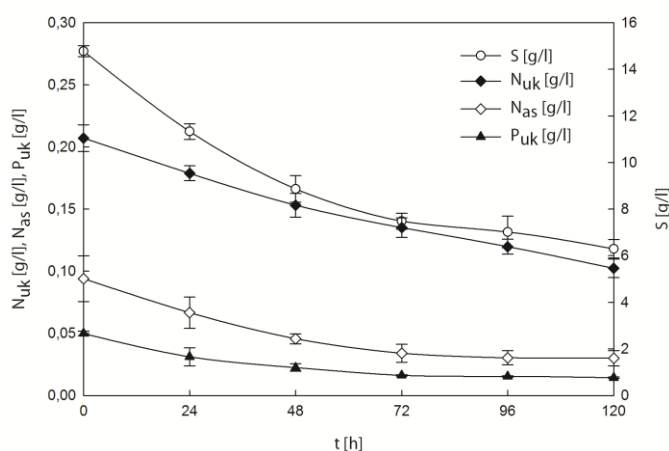
Са резултата приказаних на слици 5.24. може се видети да се садржај извора угљеника у ферментационом медијуму смањује током трајања биопроцеса, са почетне концентрације од око 15,27 g/l до крајње од око 4,25 g/l. Поред тога, промена садржаја укупног (иницијална вредност износи око 0,223 g/l) и асимилабилног (иницијална вредност износи око 0,071 g/l) азота је најинтензивнија у првих 48 часова биосинтезе, након чега су промене садржаја ових нутријената незнатне и готово константне до краја биосинтезе када достижу вредности од 0,094 g/l и 0,020 g/l, редоследом. Исти тренд се примећује и код промене садржаја укупног фосфора, са почетне вредности од око 0,046 g/l до вредности од око 0,015 g/l коју постиже у 120-ом часу биосинтезе ксантана.

5.3.2.7. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње безалкохолних пића

Технологија производње безалкохолних пића и воћних сокова обухвата производне фазе, као што су прање, уситњавање, прерада, филтрирање, грејање, хлађење и флаширање, при чему свака од њих генерише одређену количину отпадних токова. У индустрији воћних сокова, губици производа (посебно губитак воћних концентрата) и шећера који се често додаје, су значајан део отпадних вода. Ове отпадне воде садрже органске загађиваче са високим уделом угљених хидрата, при чему су велики део шећери који потичу из остатака и губитака производа (Rosenwinkel et al., 2005). За одабир отпадне воде из производње безалкохолних пића значајна је чињеница да су оне доступна сировина на територији АП Војводине и да нису познате њене алтернативне примене у производњи неког високовредног производа.

Табела 5.26. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње сока од јабуке током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,2653	0,4875	20,64 ± 1,36
72	0,9452	0,3678	40,51 ± 3,25
96	1,4399	0,3374	53,04 ± 2,84
120	1,6618	0,3285	58,56 ± 3,67



Слика 5.25. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње сока од јабуке

Реолошке карактеристике медијума који као основу садржи отпадну воду из производње сока од јабуке и израчунати реолошки параметри су приказани у табели 5.26. Добијене вредности указују да је дошло до повећања вредности привидног вискозитета (са 20,64 mPa·s, на 58,56 mPa·s), као и коефицијента конзистенције (са 0,2653 Pa·sⁿ на 1,6618 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање количине жељеног биополимера. Добијене вредности индекса тока које се смањују током трајања биопроцеса (са вредности 0,4875, на вредност 0,3285), а имају вредности мање од јединице, недвосмислено потврђују да је до биосинтезе жељеног производа у примењеним експерименталним условима заиста дошло.

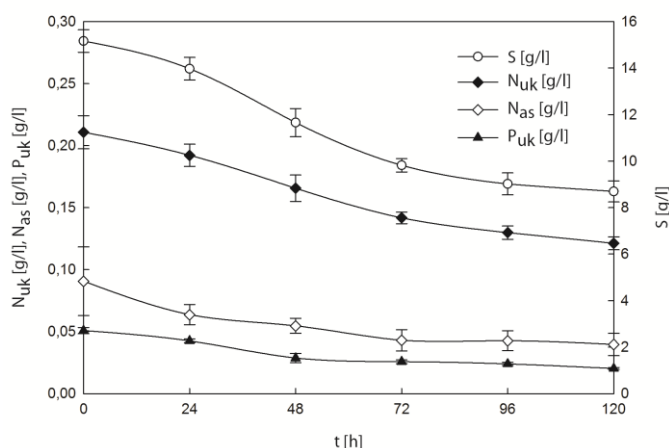
Резултати промене садржаја најзначајнијих нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње сока од јабуке, а који су приказани на слици 5.25, показују да се количина извора угљеника са почетних 14,77 g/l непрекидно смањује до вредности од око 6,29 g/l у 120-ом часу биосинтезе. Иницијална вредност укупног садржаја азота износи око 0,207 g/l и равномерно се смањује током биосинтезе да би на крају достигла вредност од око 0,102 g/l. Садржај асимилабилног азота се у ферментационом медијуму у прва 72 часа смањује од иницијалих око 0,094 g/l до 0,046 g/l, након чега до краја биосинтезе благо опада до вредности од 0,03 g/l. Исти тренд промене показује и садржај фосфора током трајања биосинтезе, са почетном концентрацијом око 0,05 g/l и крајњом од око 0,014 g/l.

У табели 5.27. приказани су реолошки параметри и привидан вискозитет ферментационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње сока од брескве током биосинтезе ксантана. Добијени резултати показују да је дошло до повећања привидног вискозитета (са вредности 12,42 mPa·s, на вредност од 26,64 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,1276 Pa·sⁿ, на вредност 0,3464 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе, док су добијене вредности индекса тока мање од јединице и смањују се током биосинтезе (са вредности 0,5325, на вредност 0,4851). Добијени резултати потврђују псеудопластични карактер добијених култивационих течности и недвосмислено указују и потврђују биосинтезу ксантана у примењеним експерименталним условима.

Табела 5.27. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње сока од брескве током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1276	0,5325	12,42 ± 0,56
72	0,1361	0,5210	12,51 ± 1,36
96	0,1699	0,5180	15,39 ± 2,55
120	0,3464	0,4851	26,64 ± 2,74

На слици 5.26. приказана је промена садржаја извора угљеника током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње сока од брескве, са почетне вредности која износи око 15,16 g/l до вредности од око 8,69 g/l на крају биосинтезе. Концентрација укупног азота уједначено је опадала током биосинтезе, од иницијалне вредности која износи око 0,211 g/l, да би на крају достигла вредност од око 0,121 g/l укупног азота у култивационом медијуму. Садржај асимилабилног азота у култивационом медијуму се смањује током трајања биопроеца, са почетне концентрације од око 0,091 g/l до крајње од око 0,04 g/l. У току првих 48 часова биосинтезе дошло је до промене садржаја фосфора са иницијалне вредности од 0,051 g/l до 0,029 g/l, након чега његова вредност остаје готово константна до краја биопроеца и износи 0,02 g/l



Слика 5.26. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње сока од брескве

5.3.2.8. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохолних пића

Индустрија алкохолних пића представља значајну и веома развијену индустријску грану, која генерише велике количине отпадних ефлуената, или током целе године као што је то случај са производњом пива, или је сезонског карактера као што је то случај са производњом вина. У производњи пива количина и састав отпадних вода значајно варирају са временом, како по сатима у једном дану, тако и по данима у недељи. Органске компоненте у отпадној води пиваре су углавном лако биоразградиве и углавном се састоје од шећера, растворљивог скроба, етанола и испарљивих масних киселина, док се чврсте материје отпадне воде састоје од остатака сировине, дијатомејске земље коришћене у процесу, квасца и талога. Вредности рН су последица количине и типа хемикалија које се користе приликом процеса прања (нпр. фосфорна киселина, азотна киселина), а количине азота и фосфора углавном зависе од руковања сировим материјалом и количине ћелија квасца присутних у ефлуенту. Висок ниво фосфора такође може да потиче од хемикалија које се користе приликом прања (Brito et al., 2007, Гаћеша, 1980).

Отпадне воде из производње вина могу садржати остатке међупроизвода процеса производње, вино лошијег квалитета, покварено вино и вино које доспева у отпадну воду током прања погона и опреме у винарији, производе који се користе за третирање вина у циљу побољшања сензорних карактеристика, као и производе за чишћење и дезинфекцију. Ове отпадне воде су биоразградиве и садрже значајне количине органских компоненти (Brito et al., 2007).

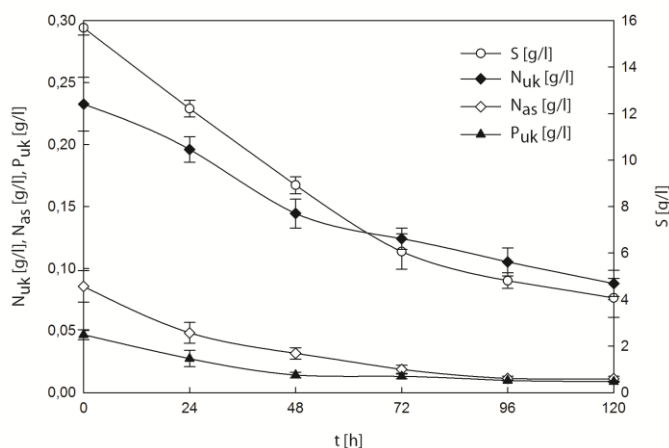
Првенствено због обима производње пива и вина у АП Војводини и количине генерисаних отпадних токова које се не могу занемарити, од великог је значаја испитивање могућности њихове примене као сировине у биотехнолошкој производњи ксантана. У ранијим истраживањима доказана је могућност производње ксантана применом отпадне воде од испирања тропа, која настаје у једној од фаза при производњи пива, као основе ферментационог медијума (Додић, 2000). Такође, потврђена је могућност примене отпадних вода које настају у различитим фазама производње белог и розе вина као основе ферментационог медијума за производњу овог тржишно вредног производа (Вајић et al., 2015d; Rončević et al., 2015).

Вредности реолошких параметара и привидног вискозитета медијума који као основу садржи отпадну воду из производње пива током биосинтезе ксантана су приказане у табели 5.28. Да је дошло до повећања количине жељеног биополимера може се закључити на основу повећања привидног вискозитета (са вредности 15,20 mPa·s, на вредност од 83,67 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,1552 Pa·sⁿ, на вредност 3,4023 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе овог биополимера. Поред тога, вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,5337, на вредност 0,2563), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности што је несумњива потврда биосинтезе ксантана.

На слици 5.27. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива.

Табела 5.28. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње пива током биосинтезе ксантана

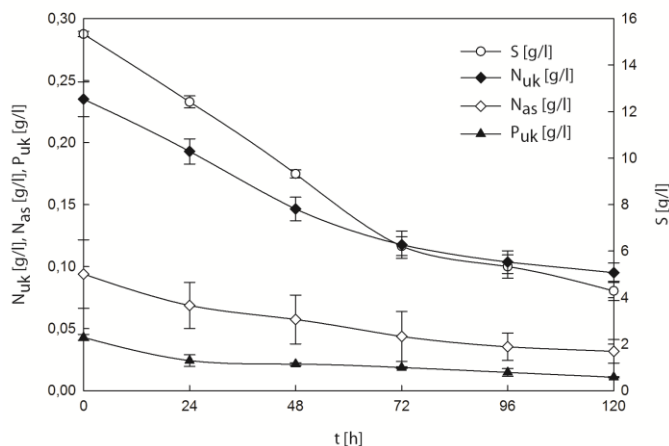
t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1552	0,5337	15,20 ± 1,11
72	0,4101	0,4800	30,74 ± 1,85
96	1,1797	0,3678	50,56 ± 1,45
120	3,4023	0,2563	83,67 ± 1,62



Слика 5.27. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

Табела 5.29. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње вина током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,3348	0,4690	23,76 ± 1,21
72	0,5523	0,4287	32,06 ± 3,52
96	1,3396	0,3608	55,45 ± 2,12
120	2,1916	0,3253	76,01 ± 2,87



Слика 5.28. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

Са слике 5.27. уочава се константно смањење садржаја извора угљеника током свих 120 часова трајања биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива, са вредности од око 15,69 g/l на 4,07 g/l колико износи на крају биосинтезе. Садржај укупног азота, са почетне вредности која износи око 0,233 g/l, се константно смањује током биосинтезе, при чему је ово смањење најинтензивније у првих 48 часова када достиже вредност од 0,144 g/l, док на крају процеса износи 0,088 g/l. Долази до константног смањења вредности садржаја асимилабилног азота са вредности од око 0,086 g/l на крајњу вредност од 0,011 g/l. У току првих 48 часова садржај укупног фосфора опада са вредности 0,047 g/l до 0,014 g/l, након чега наставља да се смањује блажим интензитетом до краја процеса када износи 0,009 g/l.

Реолошки показатељи и вредности реолошких параметара култивационих течности добијених током биосинтезе ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње вина су приказани у табели 5.29. С обзиром да добијени резултати показују повећање привидног вискозитета култивационих течности (са вредности 23,76 mPa·s, на вредност од 76,01 mPa·s), као и вредности коефицијента конзистенције истих (са вредности 0,3348 Pa·sⁿ, на вредност 2,1916 Pa·sⁿ) и смањење вредности индекса тока (са вредности 0,4690, на вредност 0,3253) може се закључити да је дошло до синтезе као и повећања количине жељеног производа током биосинтезе ксантана на примењеном култивационом медијуму.

На слици 5.28. приказана је промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње вина. На основу резултата приказаних може се видети да је највећи део присутног извора угљеника усвојен током прва 72 часа биосинтезе и његова промена се кретала од иницијалне која износи око 15,33 g/l до крајње вредности која износи око 4,29 g/l. Садржај укупног азота се такође интензивно смањује, са почетне вредности од око 0,235 g/l, током првих 72 часа биосинтезе када достиже вредност од 0,118 g/l, након чега благо опада до краја биосинтезе и вредности од 0,095 g/l. Садржај асимилабилног азота у ферментационом медијуму се смањује током трајања биопроцеса, са почетне концентрације од око 0,094 g/l до крајње од око 0,032 g/l. Промена садржаја фосфора је значајна током прва 24 часа биосинтезе, са вредности од око 0,043 g/l до око 0,024 g/l након чега се веома благо смањује до краја биосинтезе и достиже око 0,011 g/l.

5.3.2.9. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола

Поступком добијања алкохола из шећерних, скробних или лигноцелулозних сировина као споредни производ настаје велика количина дестилеријске џибре. По саставу џибра је водени раствор остатака ферментационе комине добијен након дестилације која садржи високе вредности ХПК и БПК, азота, фосфора, калијума, тешких метала и има одређену хранљиву вредност. Најчешће, џибра садржи мање од 10% суве материје, од којих су 90% протеини из сировине и ћелија производног микроорганизма док остатак садржи неизреаговале шећере, етанол, воскове, масти, влакна и минералне соли (Бранковић Илић и сар., 2007; Mohana et al., 2009).

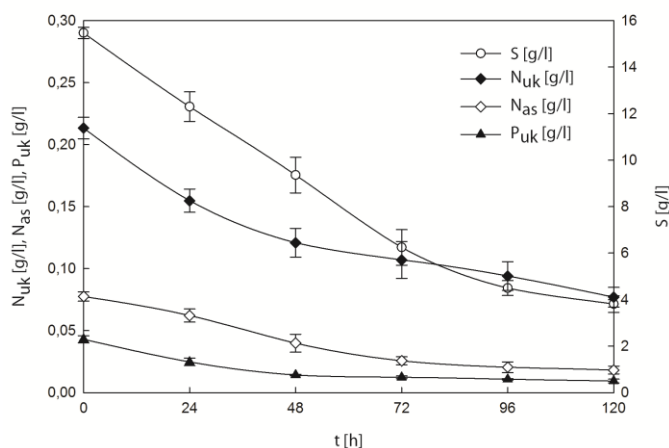
На одабир отпадног тока из производње алкохола значајно утиче чињеница да су ови ефлуенти доступна сировина у току целе године на територији АП Војводине и да потенцијално садрже значајне количине нутријената које могу имати стимулаторни утицај на биосинтезу ксантана. Једини потенцијални недостатак примене ових ефлуената јесте њихова алтернативна употреба као сточне хране или ђубрива.

У табели 5.30. приказани су резултати реолошких параметара и привидан вискозитет ферментационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола на меласи током биосинтезе ксантана, док је на слици 5.29. приказана промена садржаја извора угљеника, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током 120 часова биосинтезе ксантана на ферментационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола на меласи.

Реолошке карактеристике медијума који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола на меласи и израчунати реолошки параметри (табела 5.30) указују на повећање вредности привидног вискозитета (са 15,16 mPa·s на 91,05 mPa·s) и вредности коефицијента конзистенције (са 0,1516 Pa·sⁿ на 3,1536 Pa·sⁿ) култивационих течности током биосинтезе што указује на промену реологије система услед повећања количине продукованог биополимера. Псеудопластични карактер култивационих течности као потврда биосинтезе ксантана је потврђен на основу вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током биосинтезе са вредности 0,5379, на вредност 0,2885.

Табела 5.30. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње алкохола на меласи током биосинтезе ксантана

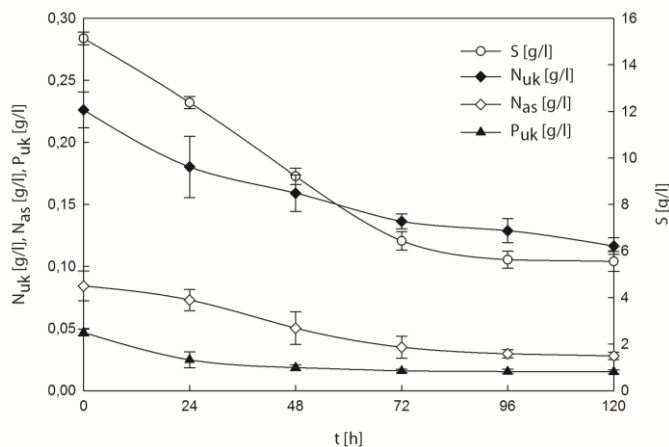
t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,1516	0,5379	15,16 ± 0,56
72	1,2478	0,3545	50,05 ± 1,55
96	1,7962	0,3499	70,42 ± 3,24
120	3,1536	0,2885	91,05 ± 2,87



Слика 5.29. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

Табела 5.31. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње алкохола из кукуруза током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,2567	0,4961	20,85 ± 2,52
72	0,9752	0,3607	40,35 ± 3,23
96	1,5371	0,3226	52,60 ± 3,12
120	1,7995	0,3142	59,05 ± 3,58



Слика 5.30. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола из кукуруза

Садржај извора угљеника (слика 5.29) је након инокулације износио око 15,47 g/l, док је у примењеном култивационом медијуму након биосинтезе остало око 3,81 g/l угљеника. Почетна вредност садржаја укупног азота износи око 0,213 g/l и уочава се интензивно опадање његових вредности у току првих 48 часова биосинтезе, након чега се њихов садржај смањује значајно мањим интензитетом до краја биопроцеса и достиже вредност од 0,077 g/l. Садржај асимилабилног азота у медијуму се смањује током трајања биопроцеса, са почетне количине од око 0,078 g/l до крајње од 0,018 g/l. Промена садржаја фосфора од иницијалне вредности која износи 0,043 g/l се интензивно смањује током првих 48 часова биосинтезе и достиже вредност од 0,014 g/l, након чега се веома благо смањује до краја биосинтезе када износи 0,009 g/l.

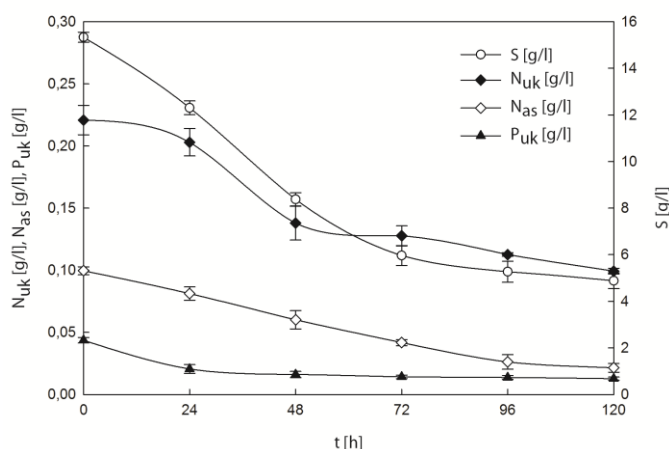
Вредности реолошких параметара и привидан вискозитет медијума који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола из кукуруза током биосинтезе ксантана је приказан у табели 5.31. Добијени резултати показују да је вредност индекса тока, која потврђује псеудопластичан карактер култивационе течности, мања од јединице и да се током биосинтезе смањује са вредности 0,4961, на вредност 0,3142. Поред тога, резултати показују да је дошло до повећања привидног вискозитета (са вредности 20,85 mPa·s, на вредност од 59,05 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,2567 Pa·sⁿ, на вредност 1,7995 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање количине жељеног биополимера.

Резултати приказани на слици 5.30. указују да је смањење садржаја извора угљеника са почетне вредности од око 15,13 g/l до 72 часа култивације готово линеарно када износи 6,43 g/l. Након 72-ог часа биосинтезе његова вредност наставља да се смањује много мањим интензитетом до краја биосинтезе и достиже вредност од око 5,55 g/l. На основу добијених резултата уочава се интензивно смањење садржаја укупног азота током првих 48 часова култивације са иницијалне вредности која износи око 0,226 g/l до вредности од око 0,159 g/l. Након 48-ог часа, садржај укупног азота благо опада, а по завршетку биосинтезе је у ферментационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола из кукуруза заостала количина неискоришћеног азота од око 0,117 g/l. Садржај асимилабилног азота у ферментационом медијуму се смањује током трајања биопроцеса, са почетне концентрације од око 0,084 g/l до крајње од око 0,028 g/l. Промена садржаја фосфора од иницијалне вредности која износи 0,047 g/l се интензивно смањује током прва 24 часа биосинтезе и достиже вредност од 0,025 g/l, након чега се смањује до краја биосинтезе и у 120-ом часу износи 0,015 g/l.

Вредности реолошких параметара и привидан вискозитет ферментационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола из скробних сировина током биосинтезе ксантана су приказане у табели 5.32. Добијени резултати показују да је дошло до повећања привидног вискозитета (са вредности 20,68 mPa·s на вредност од 59,14 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,2640 Pa·sⁿ на вредност 1,9683 Pa·sⁿ) култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање количине биополимера који мења реологију система. Вредности индекса тока које су мање од јединице и смањују се током трајања биопроцеса (са вредности 0,4888 на вредност 0,2965), указују на псеудопластични карактер добијених култивационих течности што је несумњива потврда биосинтезе ксантана.

Табела 5.32. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње алкохола из скробних сировина током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,2640	0,4888	20,68 ± 2,55
72	0,8712	0,3678	37,34 ± 3,62
96	1,0725	0,3511	42,30 ± 2,18
120	1,9683	0,2965	59,14 ± 2,78



Слика 5.31. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола из скробних сировина

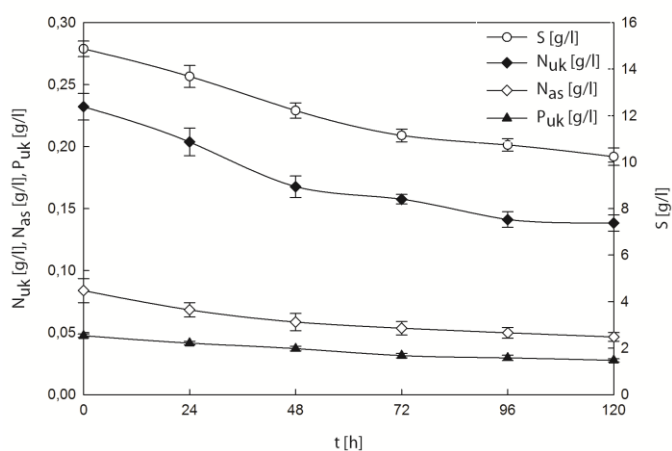
На слици 5.31. приказана је промена нутријената током биосинтезе ксантана на медијуму са отпадном водом из производње алкохола из скробних сировина. Промена садржаја извора угљеника је веома интензивна током 72 часа биосинтезе, након чега наставља да се смањује блажим интензитетом до краја биопроцеса. Вредност садржаја извора угљеника након инокулације износи 15,33 g/l, а у 120-ом часу 4,88 g/l. Промена садржаја укупног азота је у највећој мери изражена до 48-ог часа, када са иницијалне вредности 0,221 g/l достиже 0,138 g/l, и наставља да се смањује блажим интензитетом до 0,099 g/l у 120-ом часу. Садржај асимилабилног азота се константно смањивао са вредности од око 0,1 g/l, до око 0,022 g/l. Иницијална вредност фосфора се смањила са 0,044 g/l на 0,013 g/l у 120-ом часу.

5.3.2.10. Испитивање могућности биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње колагених омотача

Велики потенцијал примене отпадне воде из производње колагених омотача као основе култивационог медијума у биотехнолошкој производњи ксантана представља њихова доступност у току целе године, као и чињеница да није позната њихова секундарна употреба. Литература наводи да ове отпадне воде првенствено представљају извор протеина, имају изразито кисело карактер и садрже значајније количине хлорида и натријума услед чега је неопходно првенствено извршити анализу најзначајнијих параметара од значаја за биотехнолошку производњу, а потом и експериментално потврдити могућност њиховог искоришћења са циљем утврђивања присуства супстанци са инхибиторним утицајем на метаболизам производног микроорганизама.

Табела 5.33. Промена реологије култивационог медијума са отпадном водом из производње колагених омотача током биосинтезе ксантана

t [h]	K [Pa·s ⁿ]	n [1]	η _a [mPa·s]
48	0,0564	0,5322	5,48 ± 0,18
72	0,0836	0,5258	7,87 ± 0,26
96	0,1609	0,5162	14,45 ± 0,87
120	0,4095	0,4257	23,46 ± 2,55



Слика 5.32. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње колагених омотача

У табели 5.33. приказане су реолошке карактеристике ферментационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње колагених омотача и израчунати реолошки параметри. Добијени резултати показују да су вредности индекса тока мање од јединице и смањују се током трајања био-процеса (са вредности 0,5322, на вредност 0,4257) што указује на псеудопластични карактер добијених култивационих течности и представља потврду биосинтезе ксантана. Поред тога, резултати указују на повећање привидног вискозитета (са вредности 5,48 mPa·s, на вредност од 23,46 mPa·s) и коефицијента конзистенције (са вредности 0,0564 Pa·sⁿ, на вредност 0,4095 Pa·sⁿ) добијених култивационих течности током биосинтезе што указује на повећање количине ксантана.

Промена садржаја најзначајнијих нутријената током биосинтезе ксантана на ферментационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње колагених омотача је приказана на слици 5.32, са које се може видети да се садржај извора угљеника уједначено смањује током читавог процеса биосинтезе ксантана, са вредности од око 14,87 g/l на вредност од око 10,23 g/l. Садржај укупног азота се најинтензивније мењао у првих 48 часова, са вредности од око 0,232 g/l до вредности од око 0,168 g/l, након чега благо али константно опада до вредности од око 0,138 g/l. Промене садржаја асимилабилног азота и укупног фосфора показују исти тренд, с тим да је потрошња асимилабилног азота нешто израженија у прва 24 часа биосинтезе. Иницијалне концентрације асимилабилног азота и фосфора су биле око 0,09 g/l и око 0,05 g/l, а крајње око 0,05 g/l и 0,03 g/l, редоследом.

5.3.2.11. Процена успешности биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије

Процена успешности биотехнолошког поступка производње ксантана на култивационим медијумима који као основу садрже отпадне воде из 17 различитих фабрика прехранбене индустрије и индустрије пића је изведена одређивањем и поређењем вредности показатеља успешности овог биопроцеса, односно вредности садржаја синтетисаног ксантана, степена конверзије извора угљеника у ксантан, као и степена конверзије најзначајнијих макронутријената, извора угљеника, азота и фосфора. Добијени резултати су приказани у табели 5.34.

Табела 5.34. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије

Култивациони медијум чија је основа отпадна вода из производње и/или прераде:	P [g/l]	K _к [%]	K _с [%]	K _N [%]	K _P [%]
шећера	12,19 ± 0,21	81,61 ± 1,66	79,20 ± 2,28	59,63 ± 3,44	75,50 ± 4,38
кекса	13,18 ± 0,27	85,40 ± 2,69	75,15 ± 1,28	63,20 ± 5,56	81,48 ± 1,59
чоколаде	7,31 ± 0,18	47,63 ± 1,84	52,14 ± 1,31	45,87 ± 2,67	66,34 ± 2,35
замрзнутог воћа	7,90 ± 0,26	52,13 ± 2,22	46,54 ± 1,53	43,98 ± 1,49	50,60 ± 1,86
замрзнутог поврћа	7,12 ± 0,29	45,23 ± 1,64	53,50 ± 1,29	41,84 ± 1,39	49,37 ± 7,72
меса	6,26 ± 0,53	41,96 ± 2,96	45,21 ± 2,26	36,67 ± 1,17	52,85 ± 5,02
млека	3,25 ± 0,35	21,53 ± 1,99	36,32 ± 3,19	37,06 ± 0,94	38,13 ± 1,58
киселомлечних производа	3,89 ± 0,33	25,30 ± 1,73	33,55 ± 3,08	41,18 ± 2,45	53,59 ± 1,82
скроба	11,86 ± 0,51	77,61 ± 2,30	72,17 ± 1,29	58,11 ± 4,56	66,81 ± 0,78
сока од јабуке	9,42 ± 0,35	63,75 ± 2,32	57,42 ± 2,00	50,63 ± 1,29	71,30 ± 0,22
сока од брескве	6,14 ± 0,27	40,51 ± 2,27	42,68 ± 1,30	42,45 ± 1,66	60,11 ± 1,14
пива	12,77 ± 0,43	81,44 ± 3,50	74,12 ± 4,83	62,22 ± 1,51	80,98 ± 0,59
вина	12,56 ± 0,28	81,90 ± 1,27	72,05 ± 2,51	59,54 ± 2,02	74,73 ± 0,43
алкохола на меласи	12,98 ± 0,37	83,90 ± 1,65	75,39 ± 1,92	63,96 ± 2,21	78,22 ± 3,20
алкохола из кукуруза	9,86 ± 0,31	65,12 ± 1,14	63,35 ± 2,19	48,46 ± 1,25	67,84 ± 1,82
алкохола из скробних сировина	10,33 ± 0,22	67,36 ± 0,49	68,18 ± 1,77	54,95 ± 1,83	70,89 ± 1,41
колагенихомотача	4,97 ± 0,31	33,38 ± 1,38	31,22 ± 1,00	40,36 ± 2,24	41,86 ± 2,24

Највише вредности садржаја синтетисаног ксантана су добијене применом отпадних вода из производње кекса (13,18 g/l), алкохола на меласи (12,98 g/l), пива (12,77 g/l), вина (12,56 g/l) и шећера (12,19 g/l). На основу добијених резултата види се да применом ових отпадних вода као основе култивационих медијума сви показатељи успешности имају високе вредности. Степен конверзије извора угљеника у ксантан има вредности између 81,44-85,40%, конверзија извора угљеника 72,05-79,20%, конверзија азота 59,54-63,96% и конверзија фосфора 74,73-81,48%. Ове вредности, у примењеним експерименталним условима, су веома блиске вредностима показатеља успешности биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом, а приказаним у табели 5.5.

Од свих испитаних култивационих медијума највећа концентрација ксантана је добијена применом полусинтетичке подлоге односно глукозе као основног извора угљеника. Ово је у складу са доступним литературним подацима, где је при испитивању додатка 20 g/l различитих извора угљеника, највећи садржај синтетисаног ксантана (14,744 g/l) добијен на подлози са глукозом (Leela and Sharma, 2000). У истом истраживању, веома високе вредности садржаја ксантана су добијене применом сахарозе (13,234 g/l) и малтозе (12,321 g/l) као извора угљеника, док је применом фруктозе синтетисана мања количина ксантана (5,232 g/l). На основу добијених резултата може се закључити да применом отпадне воде из производње кекса, алкохола на меласи и шећера као основе култивационог медијума које су обogaћене сахарозом, отпадне воде из производње пива као основе култивационог медијума обogaћене малтозом и отпадне воде из производње вина обogaћене еквимоларном мешом глукозе и фруктозе, су добијени готово исти или већи садржаји ксантана иако је почетна концентрација извора угљеника била мања, односно износила је 15 g/l. Високе вредности садржаја ксантана, који је синтетисан на култивационим медијумима који су као основу садржали отпадне воде обogaћене сахарозом као извором угљеника, су и очекиване с обзиром да се сахароза, поред глукозе, најчешће користи у индустријској производњи ксантана (Garcia-Ochoa et al., 2000; Salah et al., 2010; Palaniraj and Jayaraman, 2011). Поред тога, доступна литература потврђује да су различити ефлуенти који садрже претежно сахарозу као извор угљеника, као што су меласа шећерне репе (Gilani et al., 2011b; Moosavi-Nasab et al., 2010; Mabrouk et al., 2013; Kalogiannis et al., 2003) или разређена култивациона течност из прераде шећерне трске (Faria et al., 2011), успешно примењени као сировине у биотехнолошкој производњи ксантана.

Када је отпадна вода из производње чоколаде примењена као основа култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана, вредности садржаја ксантана (7,31 g/l), конверзије у ксантан (47,63%) и степена конверзије извора угљеника (52,14%), азота (45,87%) и фосфора (66,34%) су биле ниже у поређењу са медијумом на бази отпадне воде из кексаре, шећеране и фабрике за добијање алкохола на меласи које су стартно биле обogaћене истим извором угљеника као и медијум са отпадном водом из производње чоколаде, вероватно услед присуства одређених супстанци које су успориле метаболизам производног микроорганизама.

Применом култивационог медијума са отпадном водом из производње скроба, алкохола из кукуруза и алкохола из скробних сировина добијене вредности садржаја ксантана су 11,86 g/l, 9,86 g/l и 10,33 g/l, редоследом. Вредности степена конверзије извора угљеника, конверзије извора угљеника, азота и фосфора, применом култивационих медијума који садрже горенаведене отпадне воде, имају вредности које се крећу у интервалима 65,12-77,61%, 63,35-72,17%, 48,46-58,11% и 66,81-70,89, редоследом. С обзиром да примењене отпадне воде садрже скробне сировине резултати показују да примењени сој има амилолитичку активност и веома успешно може да расте и производи жељени производ на овом извору угљеника. У истраживањима која су спровели Leela и Sharma (2000) растворљиви скроб се показао као један од извора угљеника чијом применом су добијене велике количине ксантана. Поред тога, сирови касави скроб се показао као погодан супстрат при производњи ксантана (Kerdsup et al., 2011).

Након биосинтезе ксантана на отпадној води из производње сока од јабуке као основе култивационог медијума добијено је 9,42 g/l ксантана, степен конверзије је износио 63,75%, док су вредности конверзије извора угљеника, азота и фосфора износиле 57,42%, 50,63% и 71,30%, редоследом. С друге стране, применом отпадне воде која потиче из исте гране прехранбене индустрије, односно из производње сока од брескве као основе култивационог медијума, добијене су приметно ниже вредности показатеља успешности биосинтезе, при чему је садржај

ксантана износио 6,14 g/l, степен конверзије у ксантан 40,51%, а вредности степена конверзије извора угљеника, азота и фосфора су износили 42,68%, 42,45% и 60,11%, редоследом.

Применом култивационих медијума са отпадном водом из производње замрзнутог воћа и поврћа садржај ксантана у култивационим течностима након биосинтезе је износио 7,90 и 7,12 g/l, редоследом, док су вредности осталих показатеља успешности, степена конверзије извора угљеника у ксантан, конверзије извора угљеника, азота и фосфора износиле 52,13 и 45,23%, 46,54 и 53,50%, 43,98 и 41,84%, као и 50,60 и 49,37%, редоследом. Након биосинтезе ксантана на отпадној води из производње меса као основи медијума добијено је 6,26 g/l ксантана, степен конверзије је износио 41,96%, док су вредности конверзије извора угљеника, азота и фосфора износиле 45,21%, 36,67% и 52,85%, редоследом. Применом отпадне воде из производње колагенских омотача као основе медијума примењеног за биосинтезу ксантана добијен је садржај ксантана од 4,97 g/l, степен конверзије у ксантан 33,38%, а вредности степена конверзије извора угљеника, азота и фосфора су износили 31,22%, 40,36% и 41,86%, редоследом.

Најнижи садржај синтетисаног ксантана је добијен применом култивационог медијума са отпадном водом из производње млека и киселомлечних производа. Добијене вредности садржаја ксантана, степена конверзије у ксантан, као и вредности конверзија извора угљеника, азота и фосфора након биосинтезе ксантана на медијуму са отпадном водом из производње млека су износиле 3,25 g/l, 21,53%, 36,32%, 37,06% и 38,13%, док су на медијуму из производње киселомлечних производа износиле 3,89 g/l, 25,30%, 33,55%, 41,18% и 53,59%, редоследом.

Поређењем вредности степена конверзије извора угљеника у ксантан и вредности конверзије извора угљеника након изведене биосинтезе ксантана, може се видети да су применом отпадне воде из производње шећера, кекса, замрзнутог воћа, скроба, сока од јабуке, пива, вина, алкохола на меласи, алкохола из кукурузних сировина и колагених омотача, као основе култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана, добијене више вредности степена конверзије извора угљеника. Добијени резултати указују да је у конкретним експерименталним условима производни микроорганизам, поред извора угљеника којом је ферментациони медијум био обогаћен, усвајао и неко једињење из отпадне воде које није било детектовано као редукујућа материја при њеној иницијалној анализи, а које неизоставно има стимулаторни утицај на биосинтезу ксантана. Стимулаторни утицај на биосинтезу ксантана имају различита једињења, као што су различите органске киселине (Jana and Ghosh, 1997; Shehni et al., 2011; Barboza et al., 2009), соли испарљивих масних киселина (Leite et al., 2013), детерџенти (Galindo and Salcedo, 1996; Janas et al., 2003), која се често налазе као компоненте различитих отпадних ефлуената.

Добијени резултати показују да се све примењене отпадне воде могу употребити као основа култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана, првенствено као процесна вода и извор минералних материја, а неке и као извор одређених макронутријената. Међутим, на основу резултата добијених испитивањем могућности и успешности биосинтезе ксантана применом отпадних вода из 17 различитих фабрика прехранбене индустрије, а који су обухватили праћење динамике потрошње најзначајнијих макронутријената, промена у реологији култивационих течности, вредности садржаја синтетисаног ксантана, степена конверзије извора угљенику у ксантан, као и конверзије извора угљеника, азота и фосфора, за потребе даљих истраживања одабране су отпадне воде из производње кекса, алкохола на меласи, пива, вина и шећера. Ови ефлуенти су примењени као основа култивационог медијума за биосинтезу ксантана у увећаним размерама на подлози чији састав је оптимизован применом полусинтетичке подлоге са глукозом.

5.3.3. ОПТИМИЗАЦИЈА САСТАВА ПОЛУСИНТЕТИЧКЕ ПОДЛОГЕ СА ГЛУКОЗОМ ЗА ПРОИЗВОДЊУ КСАНТАНА

На основу резултата добијених у претходним фазама истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом, а са циљем унапређења процеса производње ксантана, односно добијања максимално могуће количине жељеног производа у примењеним експерименталним условима, изведена је оптимизација састава полусинтетичке подлоге са глукозом применом методе жељене функције. За оптимизацију састава медијума за производњу ксантана, као извор угљеника одабрана је глукоза, јер представља, поред сахарозе, извор угљеника који се најчешће користи за производњу ксантана у индустријским условима и у поређењу са осталим изворима угљеника даје бољи принос жељеног производа (Leela and Sharma, 2000; Rosalam and England, 2006). За оптимизацију састава полусинтетичке подлоге одабрани су садржаји глукозе од 10,00, 30,00 и 50,00 g/l, односно одабрани опсег концентрација обухвата најнижу и највишу вредност коју предлаже литература, изнад које се сматра да може доћи до инхибиције извором угљеника (Leela and Sharma, 2000). За опис дефинисаних одзивних функција, као независне променљиве, одабрани су утицаји садржаја најзначајнијих нутријената, извора угљеника (S), азота (N_{uk}) и фосфора (P_{uk}), због њиховог значаја на биосинтезу жељеног производа и метаболизам производног микроорганизама. Као одзиви, одабрани су садржај ксантана, P [g/l], привидни вискозитет култивационих течности, η_a [mPa·s] и резидуални садржаји угљеника, rS [g/l], азота, rN_{uk} [g/l] и фосфора, rP_{uk} [g/l]. Успешност биосинтезе, односно квалитет и квантитет жељеног производа, је одређена на основу садржаја насталог ксантана и привидног вискозитета добијених култивационих течности, док садржај заосталих нутријената представља показатеље еколошке и економске ефикасности процеса. Вариране вредности независних променљивих, у складу са примењеним *Vox-Behnken*-овим експерименталним планом и вредности добијених одзива су приказане у табели 5.35.

Табела 5.35. Вредности независних променљивих и одзива након биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

независне променљиве			одзиви					K_k [%]
X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	
S [g/l]	N_{uk} [g/l]	P_{uk} [g/l]	P [g/l]	η_a [mPa·s]	rS [g/l]	rN_{uk} [g/l]	rP_{uk} [g/l]	
10	0,02	0,025	6,29	83,76	1,100	0,005	0,009	67,60
50	0,02	0,025	22,10	152,29	20,010	0,007	0,009	47,54
10	0,2	0,025	6,93	58,16	0,480	0,052	0,007	74,48
50	0,2	0,025	22,72	157,27	19,130	0,063	0,010	48,86
10	0,11	0,0045	6,61	65,87	0,980	0,014	0,001	71,04
50	0,11	0,0045	21,34	153,98	21,350	0,014	0,001	45,89
10	0,11	0,045	6,87	74,04	0,450	0,008	0,016	73,92
50	0,11	0,045	23,79	149,11	17,880	0,000	0,015	51,17
30	0,02	0,0045	18,94	130,57	4,250	0,006	0,001	67,89
30	0,2	0,0045	19,98	139,14	3,140	0,092	0,000	71,60
30	0,02	0,045	19,84	133,57	3,350	0,005	0,016	71,09
30	0,2	0,045	20,41	134,48	2,650	0,081	0,013	73,15
30	0,11	0,025	20,18	138,31	2,680	0,029	0,010	72,32
30	0,11	0,025	20,13	139,76	2,740	0,032	0,010	72,13
30	0,11	0,025	19,96	139,84	3,130	0,035	0,011	71,55

На основу резултата приказаних у табели 5.35. може се видети да су највеће вредности садржаја ксантана синтетисане применом полусинтетичке подлоге са 50,00 g/l глукозе, и крећу се у опсегу од 21,34 до 23,79 g/l, док су најниже вредности добијене применом 10 g/l глукозе и износе од 6,29 до 6,93 g/l ксантана. Поред тога, вредности степена конверзије извора угљеника у ксантан се налазе у опсегу од 45,89 до 74,48%, при чему су најниже вредности добијене применом 50,00 g/l извора угљеника (45,89-51,17%), а највише вредности са 10,00 g/l (67,60-74,48%).

Табела 5.36. Реолошки параметри култивационих течности након биосинтезе ксантана на подлози са глукозом

број експеримента	K [Pa·s ⁿ]	n [1]
1	2,3103	0,3342
2	5,1807	0,2921
3	0,7396	0,4896
4	4,8381	0,3123
5	0,8452	0,4878
6	4,9566	0,3032
7	0,9463	0,4886
8	4,7735	0,3043
9	4,5404	0,2877
10	4,7052	0,2933
11	4,528	0,2928
12	4,357	0,3019
13	4,7288	0,2911
14	4,8599	0,2877
15	4,9904	0,2825

Добијене вредности привидног вискозитета култивационих течности се налазе у опсегу између 58,16 и 157,27 mPa·s. Ове вредности су израчунате на основу реолошких параметара култивационих течности (табела 5.36), фактора конзистенције (0,7396 - 5,1807 Pa·sⁿ) и индекса тока (0,2825 - 0,4896), којим је такође и потврђено да добијене култивационе течности показују псеудопластичан тип протицања.

Добијене вредности садржаја резидуалног извора угљеника показују да је применом иницијалног садржаја глукозе од 10,00 g/l утрошено између 89,00 и 95,50%, применом 30,00 g/l утрошено је између 85,83 и 91,17 g/l, док је применом 50,00 g/l утрошено између 57,30 и 64,24% овог нутријента. Такође, на основу резидуалног азота и фосфора може се закључити да су утрошене различите количине ових нутријената у различитим огледима, при чему се вредност степена конверзије азота креће у интервалу између 54,00 и 100,00%, док је вредност конверзије фосфора у опсегу од 58,00 и 83,33%.

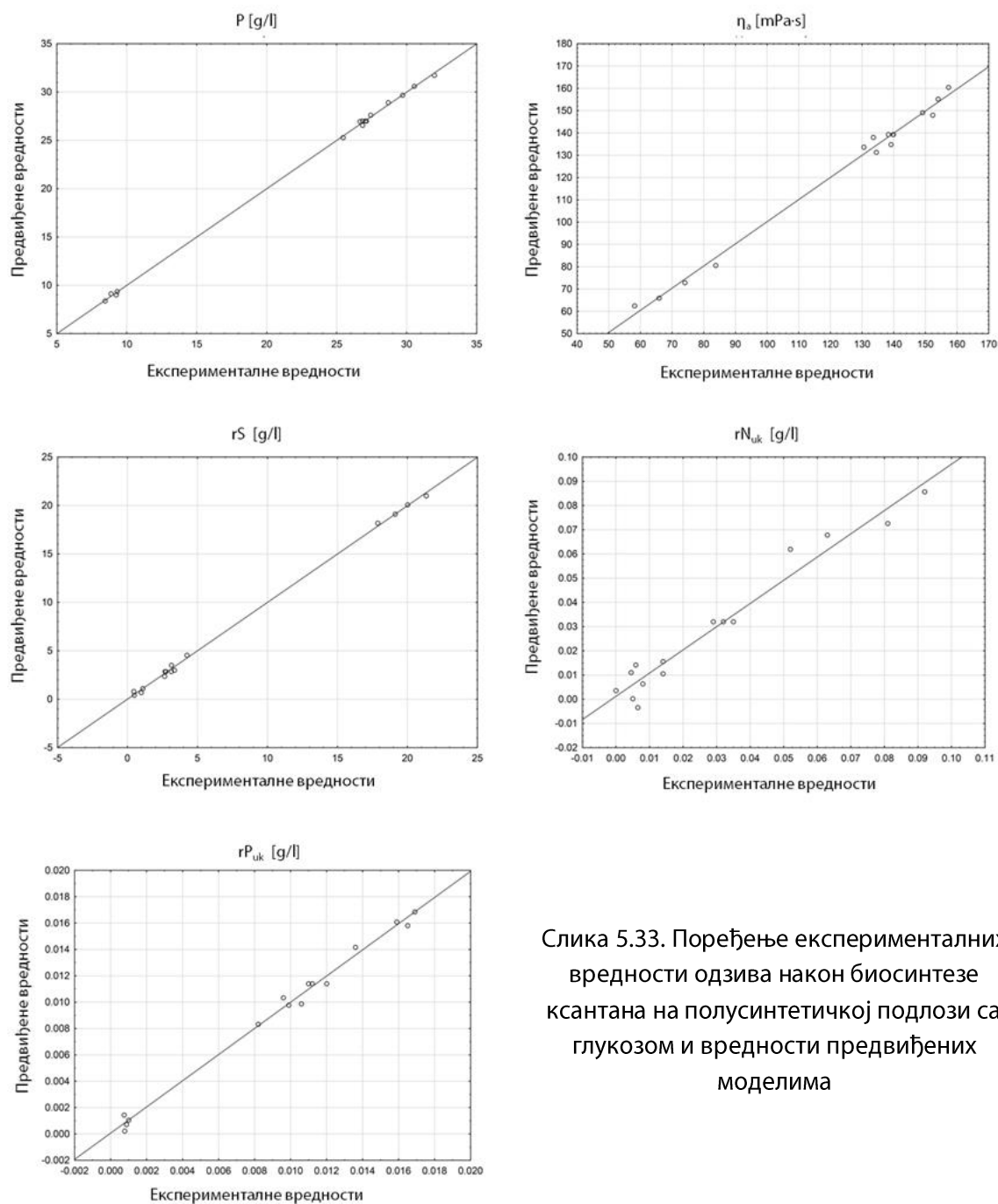
У табелама 5.37. и 5.38. приказани су резултати фитовања одабраних одзива полиномом другог реда. Значајност сваког коефицијента у добијеном моделу је одређена поређењем са *p*-вредношћу и статистички значајни коефицијенти су означени у табели 5.37.

У моделу за садржај синтетисаног ксантана значајан је линеарни и квадратни регресиони коефицијент почетног садржаја извора угљеника, као и коефицијент интеракције извора угљеника и фосфора (табела 5.37). Ови утицаји ће бити детаљније описани током дискусије слике 5.34.

Резултати статистички обрађени анализом варијансе са нивоом значајности од 0,05 (интервал поверења 95%), су приказани у табели 5.38. Коефицијент детерминације за одзив садржаја ксантана износи 0,999 чиме је потврђено веома добро слагање између добијених и предвиђених вредности. Такође, вредности коефицијената детерминације и осталих одабраних одзива, привидног вискозитета култивационе течности, резидуалног садржаја угљеника, азота и фосфора указују на одлично поклапање експерименталних и предвиђених вредности и имају вредности 0,993, 0,999, 0,958 и 0,992, редоследом.

F-вредности од 8735,359; 1020,962; 817,1045; 24,21996 и 205,9682 за садржај ксантана (Y_1), привидни вискозитет култивационе течности (Y_2), садржај резидуалног угљеника (Y_3), садржај резидуалног азота (Y_4) и садржај резидуалног фосфора (Y_5), редоследом, указују да су модели за одабране одзиве значајни.

Поред тога, поређење између експерименталних и моделом предвиђених вредности за одабране одзиве је приказано на слици 5.33.



Слика 5.33. Поређење експерименталних вредности одзива након биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом и вредности предвиђених моделима

Табела 5.37. Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за биосинтезу ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

Одзиви	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄		Y ₅	
	P [g/l]		η _a [mPas]		rS [g/l]		rN _{uk} [g/l]		rP _{uk} [g/l]	
Ефекти	К	ρ	К	ρ	К	ρ	К	ρ	К	ρ
одсечак										
b ₀	-4,503*	0,0003	20,15	0,1083	5,3847*	0,0022	-0,0288	0,2358	-0,0039	0,0826
Линеарни										
b ₁	1,166*	0,0000	5,56*	0,0001	-0,5409*	0,0000	0,0028*	0,0290	0,0001	0,3930
b ₂	11,639*	0,0440	-78,87	0,4164	-11,8792	0,2019	-0,1313	0,5081	0,0273	0,1390
b ₃	0,042	0,9984	790,68	0,1018	-13,1411	0,7292	0,6319	0,4746	0,6044*	0,0003
Квадратни										
b ₁₁	-0,013*	0,0000	-0,06*	0,0002	0,0177*	0,0000	0,0000*	0,0167	0,0000	0,0000
b ₂₂	-27,211	0,1364	-169,55	0,6129	31,6358	0,3184	2,2515*	0,0181	-0,155*	-0,1551
b ₃₃	-173,03	0,5930	-8509,94	0,2290	568,1265	0,3602	-10,823	0,4383	-4,236*	-4,2355
Интеракције										
b ₁₂	-0,003	0,9645	4,25*	0,0261	-0,0361	0,7817	0,0013	0,6589	0,0003	0,2725
b ₁₃	1,350*	0,0060	-8,04	0,2409	-1,8156*	0,0213	-0,0049	0,7136	-0,0003	0,8027
b ₂₃	-63,567	0,3766	-1074,89	0,4597	56,4995	0,6626	-1,3668	0,6437	-0,3428	0,2023

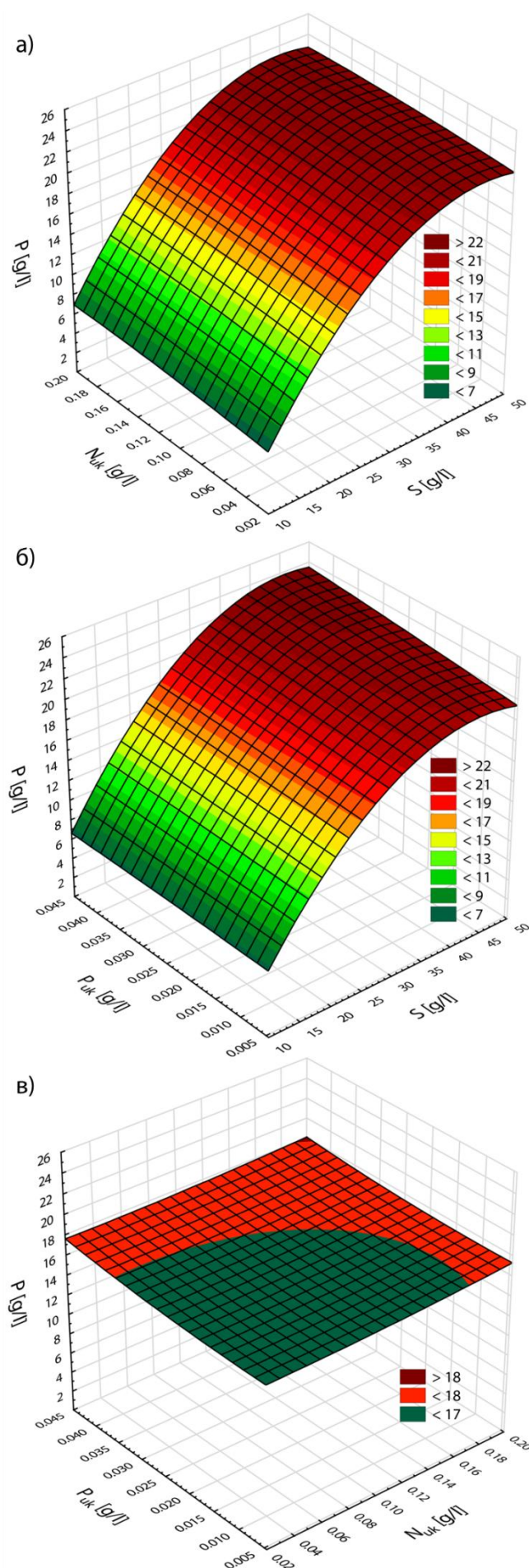
К – коефицијент, * утицај који је значајан при $p < 0,05$

Табела 5.38. Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за биосинтезу ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом

Одзив	Резидуал			Модел			F	p- вредност	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Y ₁	5	0,285	0,0570	10	4982,806	498,2806	8735,359	0,000000	0,999
Y ₂	5	119,8	23,95	10	244525,8	24452,58	1020,962	0,000000	0,993
Y ₃	5	0,988	0,1975	10	1614,143	161,4143	817,1045	0,000000	0,999
Y ₄	5	0,000513	0,000103	10	0,024853	0,002485	24,21996	0,001288	0,958
Y ₅	5	0,000004	0,000001	10	0,001494	0,000149	205,9682	0,000007	0,992

DF – степени слободe; SS – сума квадрата; MS – средња вредност квадрата.

Како би се боље разумеле интеракције фактора који утичу на биосинтезу ксантана, нацртане су одзивне површине (слика 5.34) које приказују моделом предвиђен утицај два фактора при константној вредности трећег. На слици 5.34.а. приказан је моделом предвиђен утицај почетног садржаја глукозе и азота на садржај синтетисаног ксантана, када је иницијални садржај у подлози износио 0,025 g/l фосфора. Добијени резултати показују да у целом испитиваном опсегу, у примењеним експерименталним условима, садржај азота има веома мали утицај на вредност садржаја ксантана у култивационој течности, док је утицај садржаја извора угљеника веома изражен. Такође, промена садржаја азота не утиче значајно на садржај ксантана, док при константном садржају азота промена садржаја извора угљеника значајно утиче на садржај добијеног ксантана у целом испитиваном опсегу.



Са повећањем садржаја иницијалног извора угљеника, повећава се и садржај ксантана, што је потврђено статистичком значајношћу линеарног ($p < 0,05$) и квадратног ($p < 0,05$) регресионог коефицијента иницијалног садржаја извора угљеника. Поред тога, значајност линеарног регресионог коефицијента почетног садржаја азота ($p = 0,044$), указује да је овај нутријент значајан за биотехнолошку производњу ксантана. Одзивна површина показује да се максималан садржај ксантана (више од 22,00 g/l), за све примењене вредности садржаја азота, добија при почетном садржају извора угљеника између 45,00-50,00 g/l.

Одзивна површина приказана на слици 5.34.6 приказује моделом предвиђен утицај почетне концентрације извора угљеника и фосфора, при константној вредности садржаја азота (0,11 g/l) на садржај произведеног ксантана. Коефицијент интеракције садржаја угљеника и фосфора има статистички значајан утицај ($p = 0,006$) на садржај ксантана и њихова позитивна интеракција (табела 5.37) указује на њихов синергистички утицај. Добијена одзивна површина показује да је максималан садржај ксантана (више од 22,00 g/l) добијен применом 45,00-50,00 g/l извора угљеника и највећих примењених концентрација фосфора (око 0,045 g/l). Међутим, у целом испитиваном опсегу примењених концентрација фосфора (0,0045-0,045 g/l), за вредности садржаја глукозе од 45,00-50,00 g/l, добијене су високе вредности садржаја ксантана (веће од 22 g/l).

Слика 5.34. Садржај ксантана у полусинтетичкој подлози са глукозом, као функција две променљиве при константној вредности треће:

а – садржај фосфора (0,025 g/l);

б – садржај азота (0,11 g/l);

в – садржај извора угљеника (30,00 g/l)

На слици 5.34.в. приказан је моделом предвиђен утицај садржаја почетног азота и фосфора на садржај ксантана током биосинтезе, при садржају извора угљеника од 30 g/l. Добијени резултати показују да је максимална концентрација ксантана (око 18 g/l) добијена када је култивациони медијум садржао највеће примењене вредности иницијалног азота и фосфора (0,045 g/l и 0,20 g/l), док је најмање ксантана синтетисано применом најнижих вредности азота и фосфора (0,0045 g/l и 0,02 g/l).

За одређивање оптималног садржаја глукозе, азота и фосфора у полусинтетичкој подлози за производњу ксантана примењена је метода жељене функције. Као једини циљ оптимизације дефинисано је постизање највећег садржаја ксантана у примењеним експерименталним условима, при чему је постављен опсег жељених вредности од 20,00–23,79 g/l. При овим условима, максимална вредност жељене функције износи 1,000, за почетне садржаје глукозе 30,56 g/l, азота 0,14 g/l и фосфора 0,03 g/l. При наведеном саставу полусинтетичке подлоге, моделом предвиђена вредност количине ксантана износи 20,58 g/l, привидни вискозитет култивационих течности 139,12 mPa·s, док вредности резидуалног извора угљеника, азота и фосфора износе 2,79 g/l, 0,045 g/l и 0,012 g/l, редоследом.

На основу добијених резултата оптимизације састава полусинтетичке подлоге са глукозом, може се видети да најбоља концентрација овог извора угљеника за производњу ксантана, у примењеним експерименталним условима, износи око 30,00 g/l. Добијени резултати концентрације извора угљеника се слажу са вредностима које су добили и Gilani и сарадници (2011b) и који тврде да је за најбољи принос ксантана одговарајући садржај примењеног извора угљеника управо 30 g/l.

Са циљем валидације развијених модела изведена су три додатна експеримента, применом истих експерименталних услова и оптимизованих вредности садржаја извора угљеника, азота и фосфора. На основу добијених резултата валидационог експеримента, приказаних у табели 5.39, може се закључити да се експериментално добијене вредности веома добро слажу са предвиђеним вредностима развијених модела посматраних одзива.

Табела 5.39. Резултати валидације развијених модела при оптимизованом саставу полусинтетичке подлоге са глукозом

	Експериментално добијене вредности	Вредности предвиђене моделом
P [g/l]	21,41 ± 0,26	20,58
η_a [mPas]	144,36 ± 3,11	139,12
rS [g/l]	3,25 ± 0,36	2,79
rN_{uk} [g/l]	0,039 ± 0,003	0,045
rP_{uk} [g/l]	0,010 ± 0,002	0,012

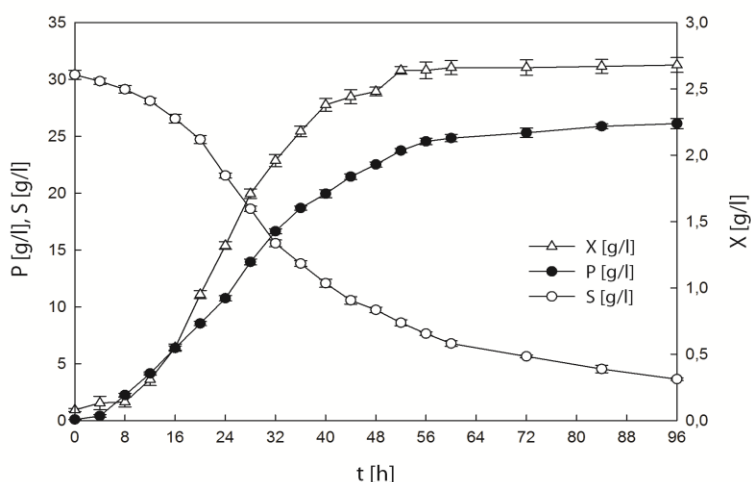
Резултати добијени оптимизацијом састава полусинтетичке подлоге са глукозом су искоришћени за припрему култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде из производње кекса, алкохола на меласи, пива, вина и шећера, као и за припрему оптимизоване полусинтетичке подлоге са глукозом, које су примењене за биосинтезу ксантана у увећаним размерама.

5.3.4. КИНЕТИКА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНИМ МЕДИЈУМИМА СА ЕФЛУЕНТИМА РАЗЛИЧИТИХ ГРАНА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

На основу резултата добијених у претходним поглављима овог рада и са циљем дефинисања модела постројења за производњу ксантана применом култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде из различитих грана прехранбене индустрије и индустрије пића, у овом поглављу је изведено кинетичко моделовање биосинтезе ксантана, односно дефинисање модела и одређивање кинетичких параметара дефинисаних модела, на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима који као основу садрже отпадну воду из пет различитих грана прехранбене индустрије. Отпадне воде из кондиторске индустрије, конкретно из производње кекса, затим отпадна вода из производње алкохола на меласи, пива, вина и шећера као основе култивационих медијума за производњу ксантана, су одабране на основу показатеља успешности биосинтезе ксантана, првенствено вредности садржаја синтетисаног ксантана.

5.3.4.1. Кинетике биосинтезе ксантана у увећаним размерама на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом

На слици 5.35. приказана је промена садржаја биомасе, производа и извора угљеника током биосинтезе ксантана која је изведена на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом. Резултати садржаја биомасе показују да је у току првих 8 часова биосинтезе дошло до благог пораста, са вредности која је иницијално износила 0,08 g/l, до вредности од 0,14 g/l. Након 8-ог часа може се уочити интензивнији пораст ове вредности, односно резултати приказани на слици указују да се производни микроорганизам налази у експоненцијалној фази раста до 40-ог часа биосинтезе, када вредност садржаја биомасе износи 2,38 g/l. Између 40-ог и 52-ог часа, микроорганизам се налази у фази успоравања раста, при чему садржај биомасе достиже вредност од 2,64 g/l. Након 52-ог часа све до краја биосинтезе вредност садржаја биомасе се не мења значајније и у 96-ом часу износи 2,68 g/l. Добијени резултати показују да се између 52-ог и 96-ог часа биосинтезе производни микроорганизам налази у стационарној фази раста, односно



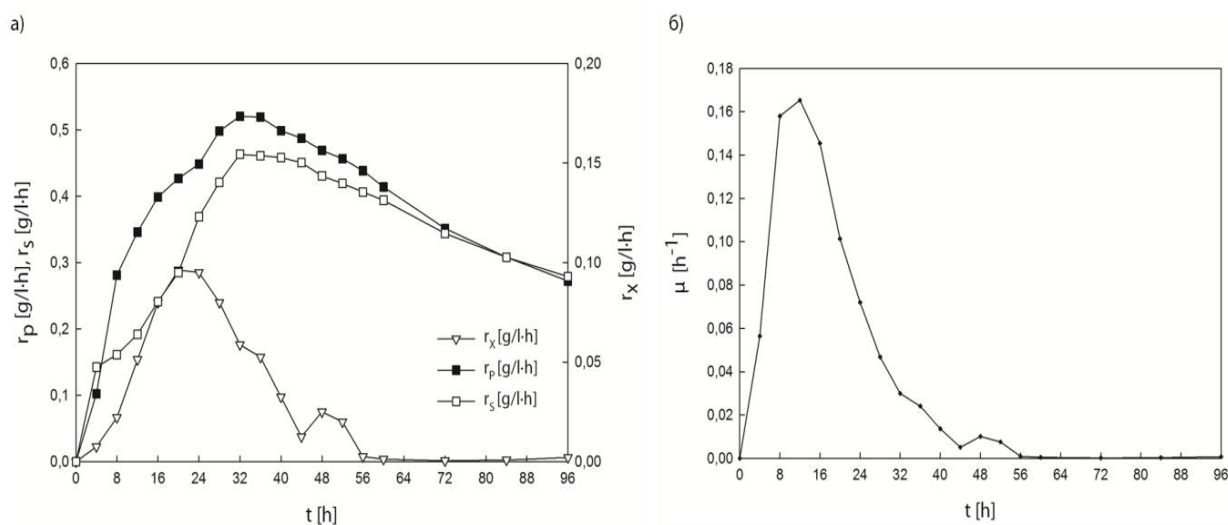
Слика 5.35. Ток биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом

да до краја биопроцеса није наступила фаза одумирања ћелија. Почетни садржај извора угљеника износи 30,41 g/l и његова вредност се током читавог процеса смањује мањим или већим интензитетом. У току првих 12 часова дошло је до благог смањења и утршка око 2,3 g/l присутне глукозе. Највеће смањење садржаја глукозе се може уочити између 20-ог и 60-ог часа биопроцеса, када се са вредности од 24,71 g/l, садржај извора угљеника смањило на вредност од 6,78 g/l.

Након тога, његова вредност наставља да опада блажим интензитетом и у 96-ом часу износи 3,65 g/l. Поред промене садржаја биомасе и извора угљеника, на слици 5.35. приказана је промена садржаја ксантана током трајања биосинтезе. Током прва 4 часа у култивационој течности је детектовано 0,41 g/l ксантана, након чега долази до значајнијег повећања његове количине и до 60-ог часа садржај ксантана се повећао на 24,84 g/l. У последњих 36 часова биосинтезе, уз веома благ пораст, садржај ксантана достиже вредност од 26,12 g/l. При поређењу вредности садржаја извора угљеника и садржаја ксантана, може се видети да су њихове промене најинтензивније до 60-ог часа, након чега се интензитет детектованих промена значајно смањује, што може бити последица повећаног вискозитета култивационе течности услед присутног ксантана, а самим тим и дифузионих ограничења преносу масе кисеоника који је неопходан за неометано функционисање производног микроорганизма и синтезу жељеног производа (Garcia-Ochoa et al., 1995).

Привидни вискозитет култивационе течности, као и резидуални садржаји азота и фосфора су одређени само у 96-ом часу биосинтезе и искоришћени су за процену успешности биосинтезе ксантана и испитивање применљивости развијених модела у увећаним размерама. Вредности садржаја ксантана (26,12 g/l), привидног вискозитета култивационе течности (184,2 mPa·s) и вредности резидуалног извора угљеника (3,65 g/l) су више, док су резидуални азот (0,025 g/l) и фосфор (0,005 g/l) нижи од вредности предвиђених моделима којима је описана биосинтеза ксантана у условима оптимизационог експеримента (табела 5.39). Ови резултати се објашњавају повољнијим условима у примењеном биореактору у поређењу са условима у ерленмајерима у којима је изведен оптимизациони експеримент.

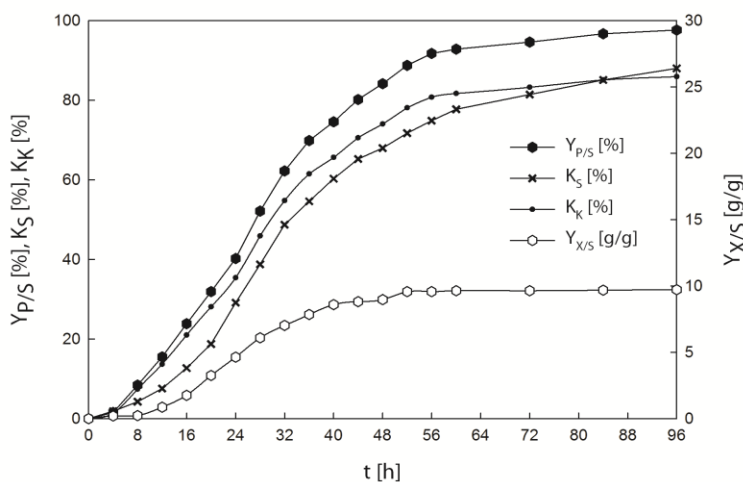
На слици 5.36.a. приказана је промена брзине производње ксантана, брзине производње биомасе и брзине потрошње извора угљеника, док је на слици 5.36.b. приказана промена специфичне брзине раста током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом. Добијени резултати показују да брзина настајања биомасе интензивно расте до 20-ог часа биосинтезе када достиже максималну вредност од 0,096 g/l·h, а потом опада до 56-ог часа до вредности блиске нули, након чега остаје непромењена до краја биопроеца. Брзина настајања производа интензивно расте током прва 32 часа биосинтезе, достиже максималну вредност од 0,52 g/l·h, а потом до 96-ог часа благо опада до 0,27 g/l·h.



Слика 5.36. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом

Сличан тренд као и код брзине настајања производа током биосинтезе ксантана је добијен код брзине потрошње супстрата односно извора угљеника. Непосредно након инокулације долази до константног пораста брзине потрошње супстрата до достизања максималне вредности од $0,46 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ у 32-ом часу када полако почиње да се смањује уз достизање крајње вредности од $0,29 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ у 96-ом часу. Специфична брзина раста, која је приказана на слици 5.33.б. уз интензиван пораст који је приметан непосредно након инокулације достиже своју максималну вредност од $0,165 \text{ h}^{-1}$ у 12-ом часу биосинтезе. Након достизања максималне вредности уочава се константно смањење специфичне брзине раста све до 56-ог часа када има вредност блиску нули, која остаје готово непромењена до краја биосинтезе ксантана.

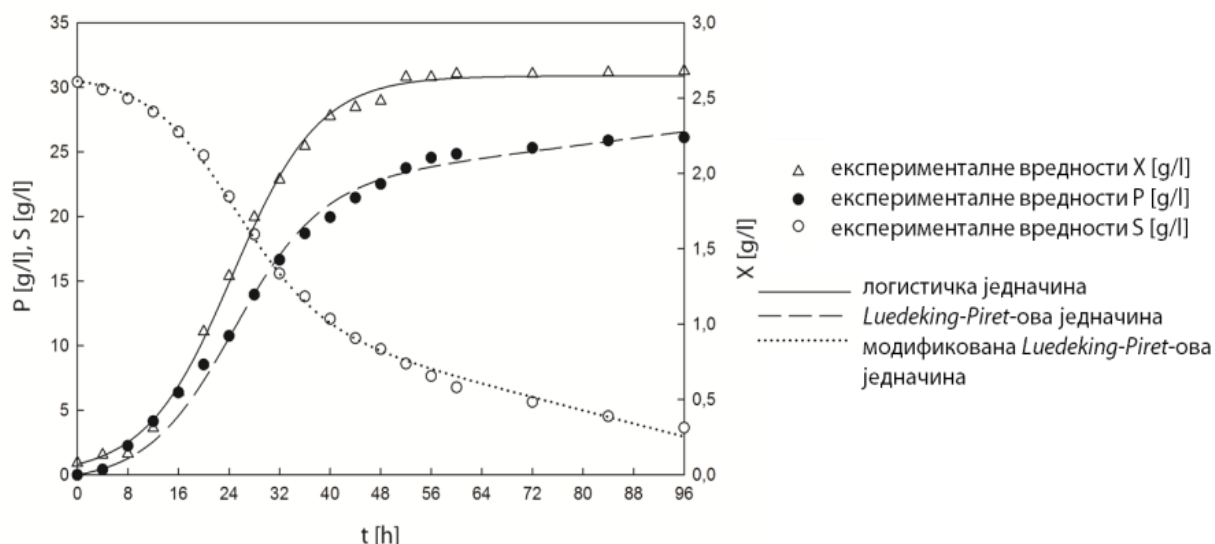
Зависности коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе ксантана на полусинтетичкој подлози са глукозом су приказане на слици 5.37. Након првих 8 часова биосинтезе ксантана и веома благе промене коефицијента приноса биомасе у односу на супстрат када је добијена вредност од $0,22 \text{ g/g}$, долази до интензивнијег пораста његове вредности све до 52-ог часа биосинтезе. У 52-ом часу биосинтезе вредност коефицијента приноса биомасе износи $9,57 \text{ g/g}$ и до 96-ог часа веома благо расте и достиже $9,72 \text{ g/g}$. Коефицијент приноса производа у односу на извор угљеника након веома благог пораста током прва 4 часа са вредности од $1,53\%$ интензивније се повећава све до 60-ог часа биосинтезе када достиже $92,83\%$. Након 60-ог часа биосинтезе пораст коефицијента приноса производа је веома



Слика 5.37. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом

слабо изражен и у 96-ом часу достиже вредност од $97,61\%$. Добијени резултати показују да се веома слична промена може уочити праћењем вредности за степен конверзије извора угљеника. Након интензивног пораста до 60-ог часа биосинтезе и вредности од $77,70\%$ може се уочити повећање мањег интензитета и достизање $88,00\%$ у 96-ом часу. Током биосинтезе ксантана, као што се може видети са слике 5.37, долази до пораста вредности степена конверзије извора угљеника у ксантан који у 96-ом часу биосинтезе достиже максималну вредност од $85,89\%$.

Кинетика умножавања биомасе (X), кинетика настајања производа (P) и кинетика нестајања извора угљеника (S) током биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом, односно добијени експериментални подаци и криве добијене фитовањем ових података у предложене кинетичке моделе применом софтверског пакета SigmaPlot®11 су приказани на слици 5.38. Експериментално одређене вредности кинетичких параметара и вредности које предвиђају примењени модели су приказане у табели 5.40.



Слика 5.38. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом

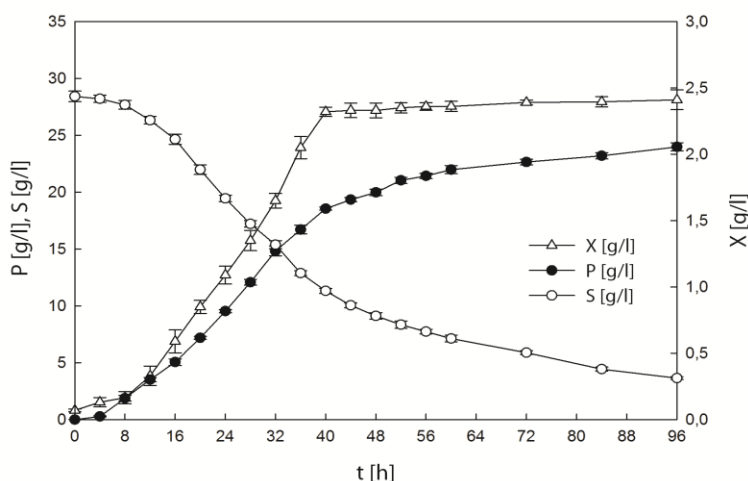
Табела 5.40. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом

параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,0715 \pm 0,0086$	$0,08 \pm 0,012$
X_m [g/l]	$2,6464 \pm 0,0193$	$2,68 \pm 0,06$
μ_m [h ⁻¹]	$0,1462 \pm 0,051$	$0,165$
α [gP/gX]	$8,5838 \pm 0,2023$	$8,595$
β [gP/gX·h]	$0,0236 \pm 0,052$	$0,0285$
S_0 [g/l]	$30,4846 \pm 0,1849$	$30,41 \pm 0,40$
γ [gS/gX]	$7,1808 \pm 0,1435$	$5,5867$
δ [gS/gX·h]	$0,0479 \pm 0,0026$	$0,054$

За описивање кинетике раста, односно фитовање добијених вредности садржаја биомасе током процеса биосинтезе ксантана на оптимизованој полусинтетичкој подлози са глукозом употребљена је логистичка једначина. Добијени резултати, приказани на слици 5.38. и у табели 5.40, као и вредност статистичког индикатора који износи 0,9980 су показали да логистичка једначина представља модел који адекватно описује кинетику настајања биомасе. За добијање кинетичких параметара и описивање синтезе ксантана и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на оптимизованој подлози са глукозом, примењене су *Luedeking-Piret*-ова једначина и модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина, редоследом. Добијени резултати (слика 5.38. и табела 5.40) показују одлично слагање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности свих параметара, осим параметра γ , који представља константу повезану са растом у моделу који описује кинетику потрошње извора угљеника. Фитовањем експерименталних вредности одабраним моделима, односно *Luedeking-Piret*-овом и модификованом *Luedeking-Piret*-овом једначином, добијене вредности статистичког показатеља исправности модела износе 0,9927 и 0,9984, редоследом. Овакви резултати указују да су примењени модели адекватни за описивање кинетике настајања производа и кинетике потрошње супстрата у примењеним експерименталним условима.

5.3.4.2. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

Резултати промене садржаја биомасе, ксантана и извора угљеника током биосинтезе ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из кондиторске индустрије, конкретно из фабрике за производњу кекса, приказани су на слици 5.39. Током првих 8 часова биосинтезе, уочава се благи пораст садржаја биомасе примењеног производног микроорганизама, са вредности од 0,065 g/l, која потиче од самог инокулума, на 0,17 g/l. Овако блага промена садржаја биомасе се очекује у лаг фази, односно фази прилагођавања производног микроорганизама на новонастале услове средине који обухватају прелаз из услова у ерленмајеру, који је примењен за припрему инокулума, у услове у биореактору у ком се одвија даља биосинтеза. Интензивна промена садржаја биомасе, која одговара променама у експоненцијалној фази раста, се може уочити између 8-ог и 40-ог часа биосинтезе када садржај биомасе достиже вредност од 2,32 g/l. Даља промена садржаја биомасе је веома блага и на крају биосинтезе достижу вредност од 2,41 g/l. Такође, овакве промене указују да је микроорганизам до краја биопроцеса остао у стационарној фази раста. Резултати промене садржаја извора угљеника током 96 часова биосинтезе указују на константно смањење његове вредности. У току првих 8 часова ово смањење је у мањој мери изражено, са вредности од 28,41 g/l до 27,68 g/l. Након 8-ог часа, садржај извора угљеника се већим интензитетом смањује до 40-ог часа

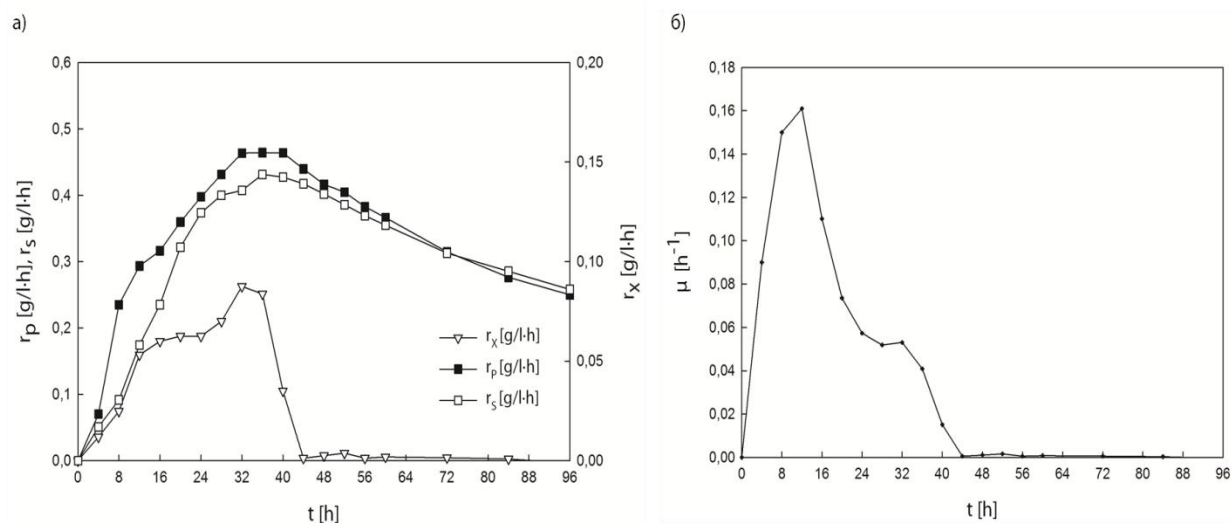


Слика 5.39. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

биосинтезе и вредности од 11,32 g/l, а потом приметно блажим интензитетом наставља да се смањује до краја биопроцеса када износи 3,65 g/l. Добијени резултати указују да се након незнатне промене садржаја ксантана до 4-ог часа и вредности од 0,28 g/l, његов садржај у култивационој течности константно повећава. До 40-ог часа биосинтезе повећање садржаја је у већој мери изражено, када достиже 18,55 g/l, након чега се садржај ксантана повећава нешто блажим интензитетом и у 96-ом часу износи 23,98 g/l.

Вредности привидног вискозитета култивационе течности, садржаја азота и фосфора, одређене су на крају биопроцеса и износе 164,63 mPa·s, 0,022 g/l и 0,004 g/l, редоследом. Добијене вредности показатеља успешности биосинтезе ксантана имају донекле ниже вредности од вредности које су добијене након биосинтезе ксантана применом оптимизоване подлоге са глукозом у увећаним размерама. Поред тога, добијена је виша вредност привидног вискозитета и садржаја ксантана од вредности које су предвиђене моделима, а који су исходили из оптимизационог експеримента (табела 5.39), што се може објаснити повољнијим условима у биореактору.

На слици 5.40.а. приказане су брзине производње ксантана и биомасе и брзина потрошње извора угљеника током 96 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње кекса.

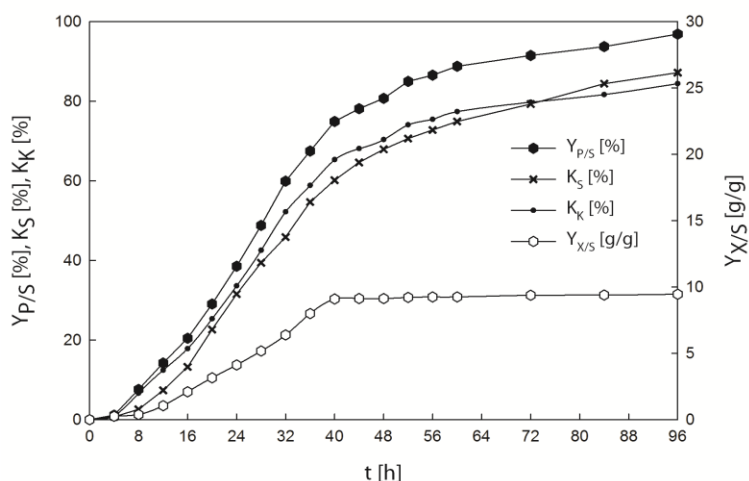


Слика 5.40. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

Добијени резултати показују да је брзина настајања биомасе расла до 36-ог часа биосинтезе и достизања максималне вредности од 0,08 g/l·h након чега њена вредност нагло опада и већ у 44-ом часу достиже вредност блиску нули, која остаје непромењена до краја биосинтезе. Брзине настајања ксантана и потрошње извора угљеника се константно повећавају до 36-ог односно 40-ог часа биопроцеса уз остваривање максималних вредности које износе 0,46 g/l·h и 0,43 g/l·h, редоследом. Након постизања максималних вредности, све до краја процеса вредности ових брзина благо али константно опадају и у 96-ом часу биосинтезе брзина настајања производа износи 0,25 g/l·h, док се брзина потрошње извора угљеника смањила на вредност од 0,26 g/l·h.

Зависност специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње кекса је приказана на слици 5.40.б. Добијени резултати показују да је до 12-ог часа вредност специфичне брзине раста веома интензивним порастом достигла максималну вредност од 0,161 h⁻¹, након чега у наредних 32 часа долази до њеног смањења на вредност блиску нули, која остаје непромењена до 96-ог часа биосинтезе.

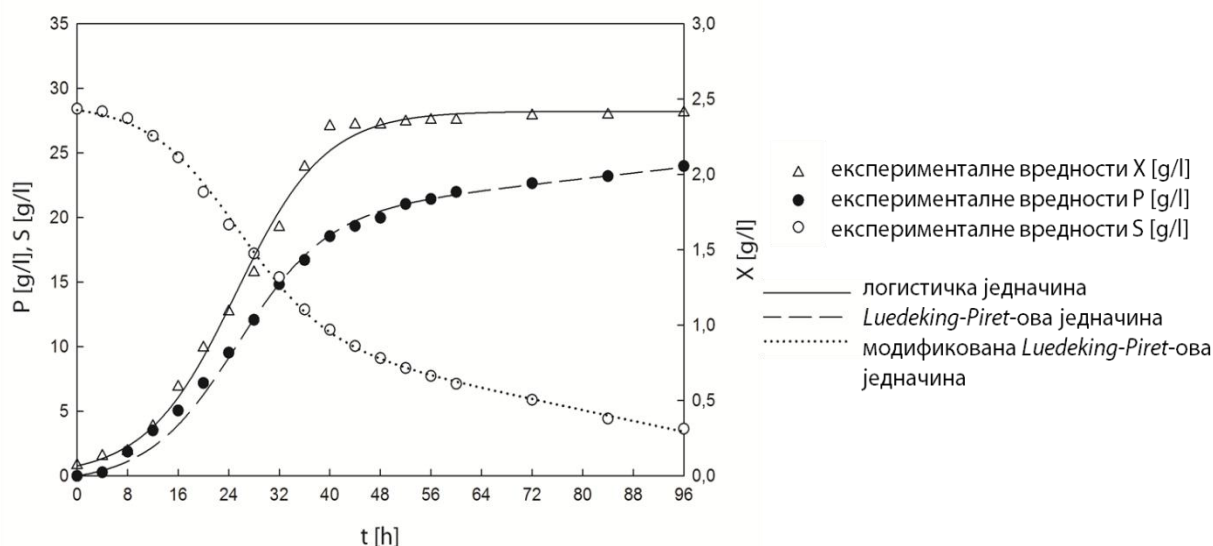
Резултати приказани на слици 5.41. представљају зависности коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан од времена трајања биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње кекса. Вредност коефицијента приноса биомасе расте све до 40-ог часа биосинтезе ксантана када износи 9,09 g/g. Након постизања ове вредности, у даљем току биопроцеса се уочавају веома благе промене коефицијента приноса биомасе у односу на примењени извор угљеника и његова вредност на крају биопроцеса износи 9,45 g/g.



Слика 5.41. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

Резултати показују да вредности коефицијента приноса производа у односу на супстрат, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан веома благо расту у току прва 4 часа биосинтезе, након чега се може уочити њихов интензивнији пораст до 60-ог часа и вредности од 88,76%, 74,91% и 77,36%, редоследом. Даље промене вредности ових параметара су мањег интензитета, а у 96-ом часу на медијуму са ефлуентом из производње кекса, њихове вредности износе 96,84%, 87,15% и 84,40%, редоследом.

За дефинисање кинетике и кинетичких параметара биосинтезе ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из кондиторске индустрије, конкретно из фабрике за производњу кекса, примењене су логистичка, *Luedeking-Piret*-ова и модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина. Резултати добијени фитовањем експерименталних вредности садржаја биомасе, ксантана и извора угљеника са горенаведеним моделима су приказане на слици 5.42 и у табели 5.41.



Слика 5.42. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

Експериментални подаци за садржај биомасе су фитовани у логистичку једначину применом одговарајућег софтверског пакета и на основу добијених резултата може се видети да моделом предвиђена вредност почетног садржаја биомасе ($X_0 = 0,0667 \text{ g/l}$) се веома добро слаже са њеном експерименталном вредношћу ($X_0 = 0,07 \text{ g/l}$). Поред тога, вредности максималне специфичне брзине раста ($\mu_m = 0,1418 \text{ h}^{-1}$) и максималног садржаја биомасе ($X_m = 2,4186 \text{ g/l}$) се поклапају са експериментално одређеним вредностима ($\mu_m = 0,161 \text{ h}^{-1}$ и $X_m = 2,41 \text{ g/l}$). За предложени кинетички модел вредност R^2 износи 0,9954. Упоредивањем експериментално одређених и моделом предвиђених података добијених дисконтинуалном култивацијом показало се да логистичка једначина представља одговарајући кинетички модел за квалитетан опис раста ћелија бактерије *Xanthomonas campestris* током биосинтезе ксантана применом медијума који као основу садржи отпадну воду кондиторске индустрије.

Табела 5.41. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње кекса

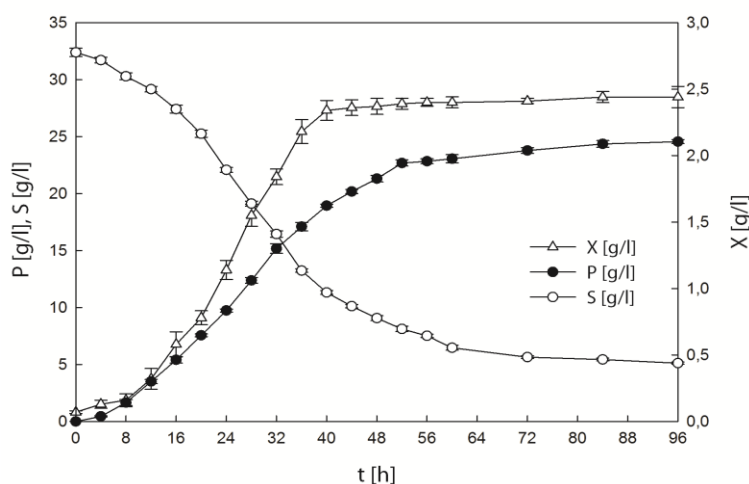
параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,0667 \pm 0,0118$	$0,07 \pm 0,01$
X_m [g/l]	$2,4186 \pm 0,0271$	$2,41 \pm 0,08$
μ_m [h^{-1}]	$0,1418 \pm 0,0073$	0,161
α [gP/gX]	$8,5060 \pm 0,1482$	8,966
β [gP/gX·h]	$0,0227 \pm 0,0038$	0,033
S_0 [g/l]	$28,3088 \pm 0,1487$	$28,41 \pm 0,12$
γ [gS/gX]	$7,4476 \pm 0,1287$	6,7871
δ [gS/gX·h]	$0,0432 \pm 0,0023$	0,049

Luedeking-Piret-ова једначина је примењена за добијање кинетичких параметара и описивање производње ксантана и резултати фитовања добијених експерименталних вредности садржаја ксантана са овим моделом су приказани на слици 5.42. и у табели 5.41. Добијени резултати показују да су вредности параметара α и β који су предвиђени примењеним моделом и износе $8,5060 \text{ gP/gX}$ и $0,0227 \text{ gP/gX}\cdot\text{h}$, редоследом, веома блиске њиховим експериментално одређеним вредностима $8,966 \text{ gP/gX}$ и $0,033 \text{ gP/gX}\cdot\text{h}$, редоследом. Одлично поклапање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности, као и чињеница да добијена вредност R^2 износи 0,9961 показују да се *Luedeking-Piret*-ов модел може применити за описивање производње ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње кекса.

За описивање кинетике потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана примењена је модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина и резултати фитовања добијених експерименталних резултата са овим моделом су приказани на слици 5.42. и у табели 5.41. Добијени резултати показују да постоји одлично слагање вредности почетног садржаја извора угљеника добијених експерименталним израчунавањем, које износи $28,41 \text{ g/l}$ и на основу предвиђања модела $28,3088 \text{ g/l}$. Поред тога, експериментално израчунате и моделом предвиђене вредности параметра који је везан за раст (γ) се разликује у малој мери, док су вредности параметра који није везан за раст (δ) веома блиске, при чему је добијена вредност R^2 која износи 0,9988. Добијени резултати показују да примењена модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина представља одговарајући модел за описивање потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње јестивог уља.

5.3.4.3. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

Промене садржаја биомасе, производа и извора угљеника, уочене током биосинтезе ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола на меласи приказане су на слици 5.43. Почетни садржај биомасе од 0,07 g/l се благо повећава до 8-ог часа биосинтезе и вредности од 0,16 g/l, а потом производни микроорганизам улази у фазу интензивног умножавања ћелија која траје до 40-ог часа када садржај биомасе достиже вредност од 2,34 g/l. Након 40-ог часа, промене садржаја биомасе су веома мале и у 96-ом часу њена вредност износи 2,44 g/l. До краја биосинтезе производни микроорганизам је остао у стационарној фази раста коју карактерише приближно једнак број новонасталих и одумрлих ћелија, односно није наступила фаза одумирања ћелија. Садржај извора угљеника се константно смањује током биопроцеса, са вредности од 32,38 g/l на вредност од 5,12 g/l. Током прва 4 часа биосинтезе садржај извора угљеника се смањио за свега 0,67 g/l, након чега се може



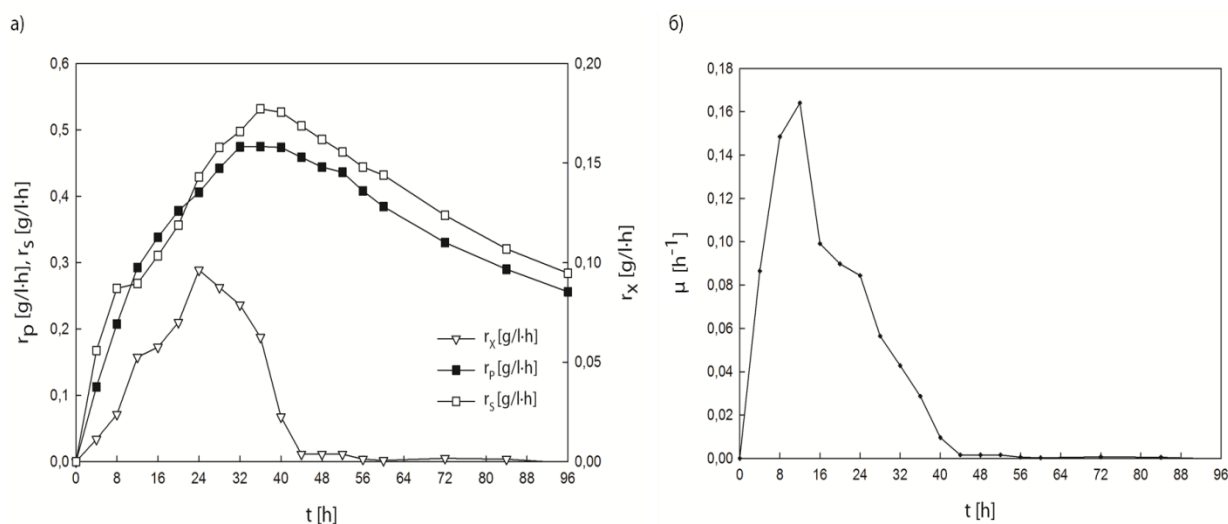
Слика 5.43. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

приметити интензивнији утршак овог нутријента до 40-ог часа и вредности од 11,35 g/l. Између 40-ог и 60-ог часа, садржај извора угљеника је смањен за 4,85 g/l, односно достиже вредност од 6,47 g/l, након чега се до краја процеса веома благо смањује. Садржај ксантана, као што се може видети из резултата приказаних на слици 5.43. повећава се током свих 96 часова биосинтезе. До 52-ог часа повећање садржаја је интензивније и достиже вредност од 22,68 g/l, док на крају процеса износи 24,56 g/l.

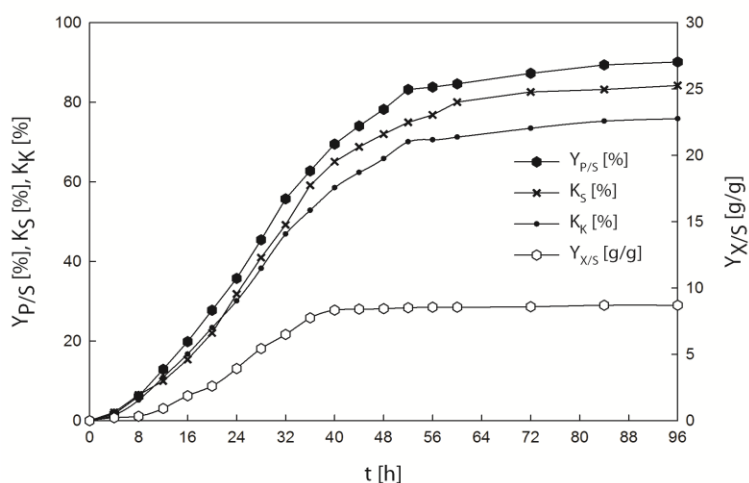
Вредности привидног вискозитета култивационе течности, садржаји азота и фосфора, су одређене на крају биопроцеса и износе 152,18 mPa·s, 0,027 g/l и 0,004 g/l, редоследом. Добијене вредности показатеља успешности биосинтезе ксантана имају вредности које су веома блиске вредностима добијеним након биосинтезе ксантана применом оптимизоване подлоге са глукозом у увећаним размерама (поглавље 5.3.4.1).

Зависности брзине производње ксантана, потрошње извора угљеника и настанка биомасе, као и специфичне брзине раста, од времена трајања биосинтезе ксантана, на отпадној води из производње алкохола на меласи као основи култивационог медијума, приказане су на слици 5.44. Са слике 5.44.a. може се уочити да је брзина настајања биомасе константно расла до 24-ог часа биосинтезе (0,096 g/l·h) након чега се наредних 20 часова њена вредност смањује и достиже 0,004 g/l·h. Након 44-ог часа брзина настајања биомасе остаје непромењена и све до краја биопроцеса има вредност блиску нули. Брзина настајања производа и брзина потрошње

супстрата интензивно расту све до 36-ог часа биосинтезе када достижу своје максималне вредности од 0,48 g/l·h и 0,53 g/l·h, редоследом. Између 36-ог и 96-ог часа биосинтезе вредности брзина настајања производа и потрошње извора угљеника се константно и уједначено смањују до 0,26 g/l·h и 0,28 g/l·h, редоследом. Непосредно након почетка биопроцеса долази до интензивног пораста вредности специфичне брзине раста (слика 5.44.б) која своју максималну вредност остварује у 12-ом часу ($0,164 \text{ h}^{-1}$). Након интензивног смањења у наредна 4 часа, на вредност од $0,099 \text{ h}^{-1}$, специфична брзина раста наставља благо да опада све до 44-ог часа када достиже вредност блиску нули коју одржава све до краја биосинтезе.



Слика 5.44. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

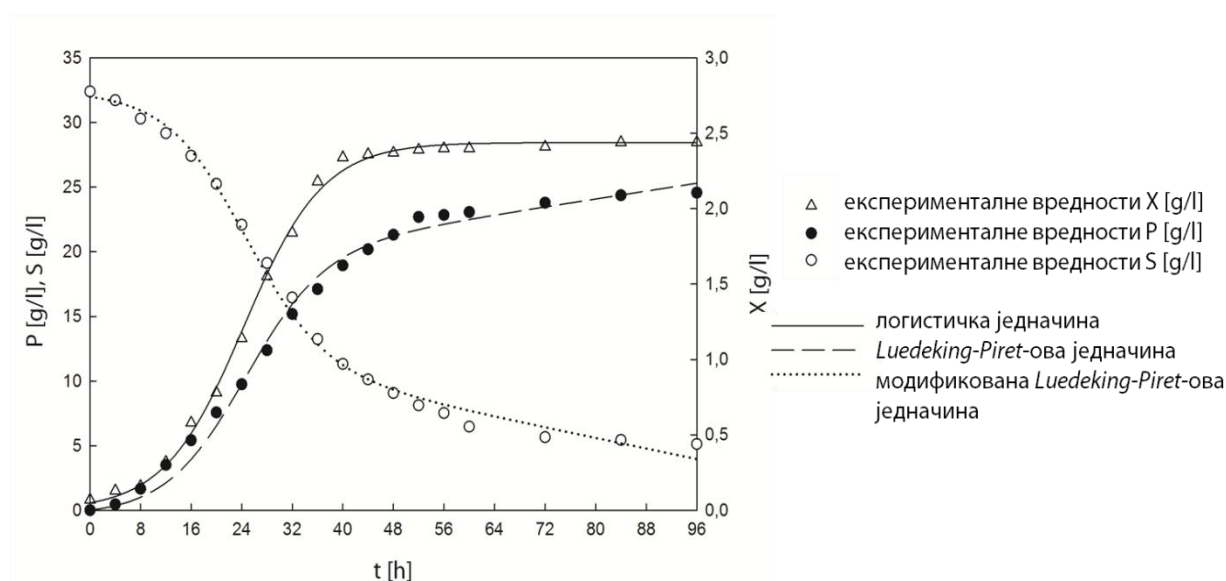


Слика 5.45. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

Зависности коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника, као и степена конверзије извора угљеника у ксантан, од времена трајања биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола на меласи приказане су на слици 5.45. Вредност коефицијента приноса биомасе у односу на супстрат након веома благог пораста током првих 8 часова и достизања 0,33 g/g, интензивно расте наредних 36 часова и достиже вредност од 8,33 g/g.

Након 40-ог часа, вредност коефицијента приноса биомасе остаје готово непромењена до краја биопроцеса када износи 8,69 g/g. Приказани резултати показују да вредност коефицијента приноса ксантана расте током свих 96 часова и на крају биопроцеса достиже вредност од 90,10%. Степен конверзије извора угљеника и степен конверзије извора угљеника у ксантан очекивано расту током трајања култивације, првих 60 часова интензивније, а након тога блажим интензитом и достижу крајње вредности од 84,18% и 75,85 %, редоследом.

Експерименталне вредности концентрације биомасе, производа и извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи ефлуент из производње алкохола на меласи су применом одговарајућег софтвера фитоване у предложене кинетичке моделе (једначине 4.11, 4.13 и 4.17) и криве које описују кинетику умножавања биомасе (X), кинетику настајања производа (P) и кинетику потрошње извора угљеника (S) су приказане на слици 5.46, док су вредности кинетичких параметара израчунате на основу експерименталних података и предвиђене примењеним моделима приказане у табели 5.42.



Слика 5.46. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

Табела 5.42. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње алкохола на меласи

параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,0493 \pm 0,0063$	$0,07 \pm 0,01$
X_m [g/l]	$2,4382 \pm 0,0162$	$2,44 \pm 0,08$
μ_m [h ⁻¹]	$0,1594 \pm 0,0054$	0,164
α [gP/gX]	$8,3089 \pm 0,2010$	8,617
β [gP/gX·h]	$0,0312 \pm 0,0052$	0,018
S_0 [g/l]	$31,9798 \pm 0,3295$	$32,38 \pm 0,36$
γ [gS/gX]	$8,6726 \pm 0,2691$	7,8067
δ [gS/gX·h]	$0,0419 \pm 0,0049$	0,043

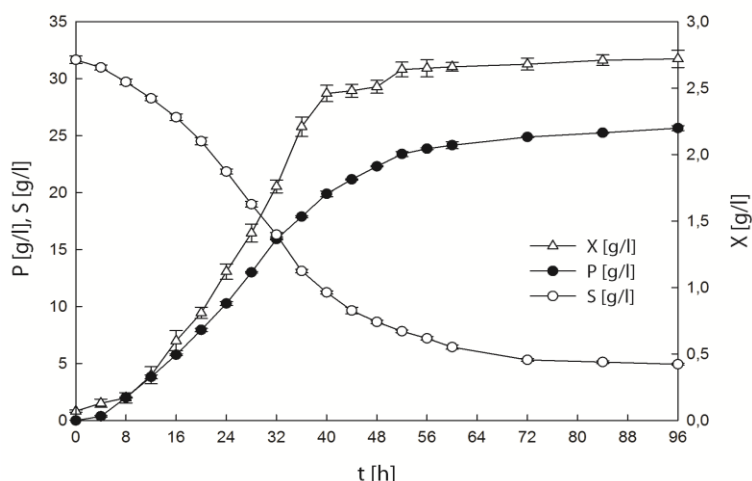
Логистичка једначина је примењена за фитовање експерименталних вредности садржаја биомасе и моделом предвиђене вредности максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста износе 2,4382 g/l и 0,1594 h⁻¹, редоследом. Добијени резултати показују одговарајуће слагање са експериментално израчунатим вредностима ових параметара који имају вредности од 2,44 g/l и 0,164 h⁻¹, редоследом. С друге стране, експериментално добијена вредност почетног садржаја (0,07 g/l) је већа од вредности предвиђене моделом (0,0493 g/l). Вредност R² износи 0,9982 што указује да примењена логистичка једначина одлично описује понашање односно раст примењеног производног микроорганизма на примењеном култивационом медијуму.

Luedeking-Piret-ова једначина је примењена за описивање кинетике настајања производа и резултати фитовања добијених експерименталних вредности садржаја ксантана са овим моделом су приказани на слици 5.46. и у табели 5.42. Добијени резултати показују да су вредности предвиђене примењеним моделом за параметре α и β веома блиске експериментално одређеним вредностима. Одлично поклапање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности, као и чињеница да добијена вредност R² износи 0,9928 показују да се *Luedeking-Piret*-ов модел може применити за описивање производње ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи примењени ефлуент.

За описивање кинетике потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана примењена је модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина и резултати фитовања добијених експерименталних резултата са овим моделом су приказани на слици 5.46. и у табели 5.42. На основу добијених резултата може се уочити одлично слагање експериментално израчунате вредности почетног садржаја извора угљеника од 32,38 g/l и моделом предвиђене вредности истог која износи 31,9798 g/l, као и слагање вредности параметра δ чија експериментална вредност износи 0,043 gS/gX·h, а моделом предвиђена 0,0419 gS/gX·h. Резултати приказани у табели 5.42. указују да једино у случају вредности параметра γ постоји разлика између експериментално одређене и моделом предвиђене вредности. Међутим, сви добијени резултати и вредност R² која износи 0,9954 указују да се примењена једначина може користити за моделовање кинетике потрошње супстрата током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње алкохола на меласи.

5.3.4.4. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

На слици 5.47. приказана је промена садржаја биомасе, извора угљеника и жељеног производа током биосинтезе ксантана, применом производног микроорганизма *Xanthomonas campestris* ATCC13951 на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива. Током првих 8 часова, промена садржаја биомасе је веома блага, и мења се са почетне вредности од 0,07 g/l до 0,17 g/l. Након 8-ог часа биосинтезе, са резултата приказаних на слици 5.47. може се закључити да је производни микроорганизам ушао у експоненцијалну фазу раста, интензивно се умножавајући и у 40-ом часу његов садржај износи 2,46 g/l. До краја биосинтезе, вредност садржаја биомасе благо расте и у 96-ом часу достиже вредност од 2,72 g/l. На добијеној криви раста производног микроорганизма може се уочити неколико тачака које благо одступају од очекиваног тренда и може се претпоставити да су оне настале као субјективна грешка аналитичара.



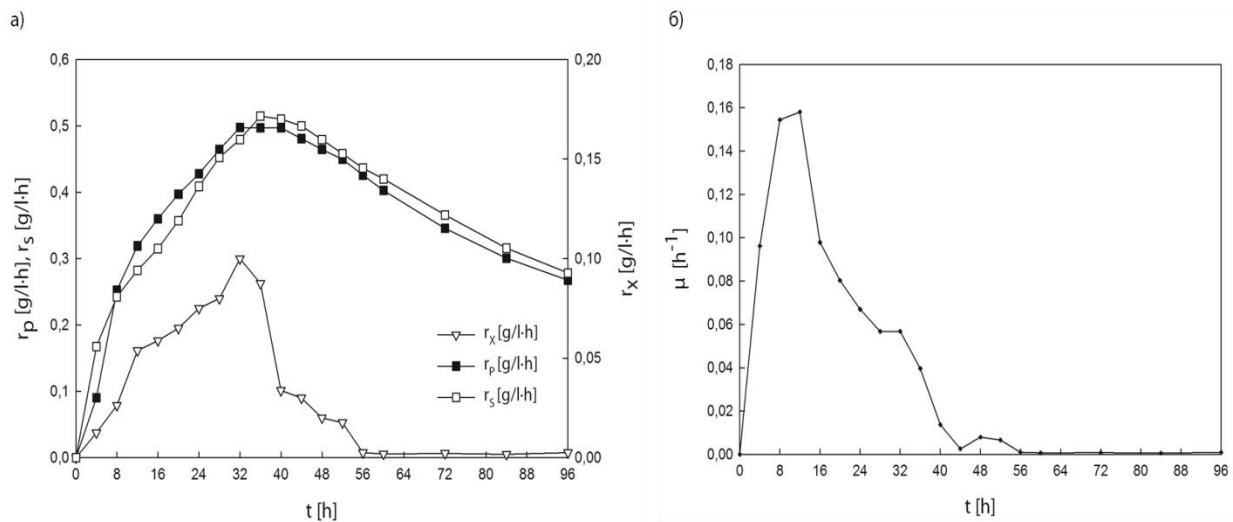
Слика 5.47. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

Садржај извора угљеника се са вредности од 31,65 g/l током првих 40 часова биосинтезе интензивно смањује на 11,24 g/l, док на крају биосинтезе његов садржај у култивационој течности износи 4,94 g/l. Током прва 4 часа биосинтезе садржај ксантана у култивационој течности износи 0,36 g/l, након чега се интензивно повећава до око 56-ог часа када достиже вредност од 23,85 g/l. У последњих 30 часова биосинтезе садржај ксантана се благо повећава и на крају биопроцеса, у 96-ом часу износи 25,66 g/l.

Вредности привидног вискозитета култивационе течности, садржаји азота и фосфора, су одређене на крају биопроцеса и износе 174,22 mPa·s, 0,023 g/l и 0,008 g/l, редоследом. Добијене вредности привидног вискозитета култивационе течности и резидуалног азота су незнатно ниже, а вредности резидуалног фосфора више од вредности које су добијене након биосинтезе ксантана применом оптимизоване подлоге са глукозом у увећаним размерама.

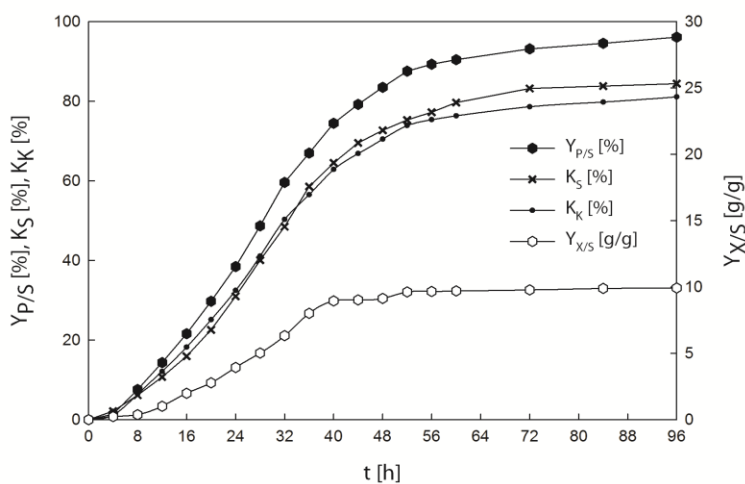
На слици 5.48.а. приказана је зависност брзине производње ксантана, брзине производње биомасе и брзине потрошње извора угљеника, док је на слици 5.48.б. приказана зависност специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива. Добијени резултати показују да брзина настајања биомасе расте до 32-ог часа када достиже максималну вредност од 0,10 g/l·h, а потом се великим интензитетом смањује до вредности од 0,034 g/l·h у наредних 8 часова биосинтезе. Између 44-ог и 56-ог часа долази до даљег смањења брзине производње биомасе и достизања вредности готово једнаке нули. Брзина настајања производа интензивно расте током првих 40 часова биосинтезе, достиже максималну вредност, а потом до 96-ог часа благо опада. Максимална вредност брзине настајања производа износи 0,50 g/l·h док вредност на крају биопроцеса износи 0,28 g/l·h. Слична промена као промена вредности брзине настајања производа је добијена и за брзину потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана. Непосредно након инокулације и започињања биосинтезе ксантана долази до константног пораста брзине потрошње извора угљеника и достизања максималне вредности од 0,52 g/l·h у 36-ом часу када полако почиње да се смањује уз достизање крајње вредности од 0,29 g/l·h у 96-ом часу.

Специфична брзина раста, која је приказана на слици 5.48.б. уз интензиван пораст који је приметан непосредно након инокулације достиже своју максималну вредност од 0,158 h⁻¹ у 12-ом часу биосинтезе. Непосредно након достизања максималне вредности уочава се константно смањење њене вредности све до 56-ог часа биосинтезе када ова величина достиже вредност блиску нули и остаје готово непромењена до краја биосинтезе ксантана.



Слика 5.48. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

Зависност коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан од времена биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива приказана је на слици 5.49. Након првих 8 часова биосинтезе ксантана и благе промене вредности коефицијента

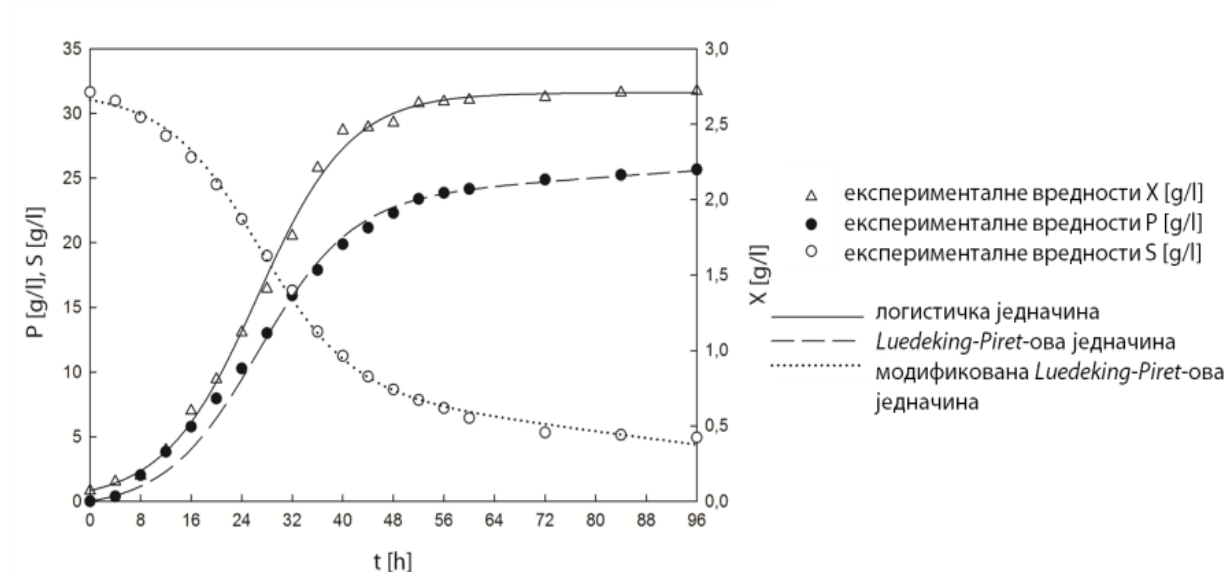


Слика 5.49. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

приноса биомасе у односу на супстрат, све до 40-ог часа долази до интензивнијег пораста његове вредности (8,95 g/g), након чега до 96-ог часа веома благо расте и достиже 9,92 g/g. Вредности приноса производа у односу на супстрат, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан благо расту у току прва 4 часа биосинтезе, након чега се може уочити интензивнији пораст до 60-ог часа и вредности од 90,42%, 79,65% и 76,31%, редоследом. Њихове даље промене су умерене, а у 96-ом часу износе 96,06%, 84,39% и 81,07%, редоследом.

Резултати приказани на слици 5.50. описују кинетику умножавања биомасе (X), кинетику настајања производа (P) и кинетику потрошње извора угљеника (S) током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива, односно приказане су измерене експерименталне вредности и криве добијене њиховим фитовањем у предложене кинетичке моделе применом одговарајућег софтверског пакета.

Такође, експериментално одређене вредности кинетичких параметара и вредности које предвиђају примењени модели су приказане у табели 5.43.



Слика 5.50. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

Експериментални подаци за садржај биомасе су фитовани у логистичку једначину при чему су добијене моделом предвиђене вредности почетног садржаја биомасе, максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста, приказане у табели 5.43, а вредност R^2 износи 0,9976. Почетна вредност садржаја биомасе коју предвиђа модел од 0,0712 g/l је веома блиска експериментално добијеној вредности од 0,07 g/l. Поред тога, моделом предвиђене вредности максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста које износе 2,7081 g/l и 0,1364 h⁻¹, редоследом, се такође добро слажу са експериментално одређеним вредностима (2,72 g/l и 0,158 h⁻¹, редоследом). Сви добијени резултати указују да примењена логистичка једначина представља одговарајући кинетички модел за опис раста производног микроорганизма *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива.

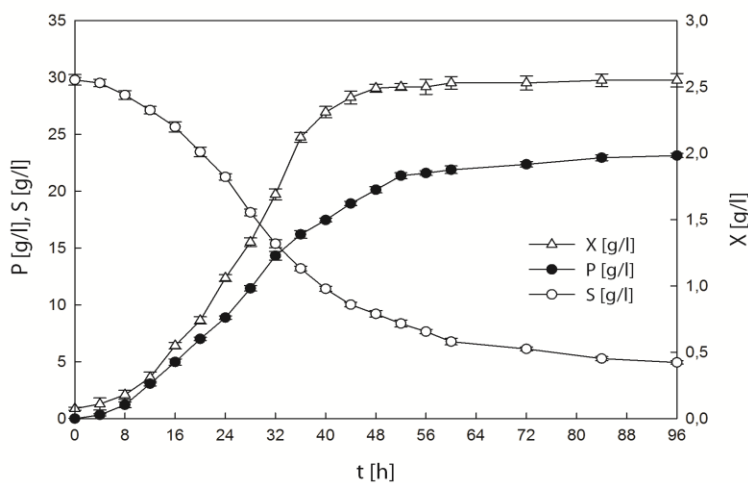
Табела 5.43. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње пива

параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,0712 \pm 0,0093$	$0,07 \pm 0,01$
X_m [g/l]	$2,7081 \pm 0,0233$	$2,72 \pm 0,07$
μ_m [h ⁻¹]	$0,1364 \pm 0,0051$	0,158
α [gP/gX]	$8,7971 \pm 0,1956$	9,579
β [gP/gX·h]	$0,0127 \pm 0,0051$	0,0148
S_0 [g/l]	$31,0369 \pm 0,1881$	$31,65 \pm 0,33$
γ [gS/gX]	$8,4216 \pm 0,1507$	8,3039
δ [gS/gX·h]	$0,0238 \pm 0,0028$	0,035

Luedeking-Piret-ова једначина и модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина су примењене за описивање производње ксантана и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње пива и добијање кинетичких параметара. Добијени резултати су приказани на слици 5.50. и у табели 5.43. и показују одлично слагање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности готово свих параметара. Једино параметар који је везан за раст α , у моделу који описује кинетику настајања производа има донекле различите експериментално одређене и моделом предвиђене вредности. Фитовањем експерименталних вредности одабраним моделима, односно *Luedeking-Piret*-овом и модификованом *Luedeking-Piret*-овом једначином, добијене вредности статистичког показатеља исправности модела износе 0,9933 и 0,9984, редоследом. Добијени резултати указују да се примењени модели могу применити за описивање кинетике настајања производа и кинетике потрошње супстрата у примењеним експерименталним условима.

5.3.4.5. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

Резултати тока биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње вина, односно промене садржаја биомасе, извора угљеника и производа, приказане су на слици 5.51. Непосредно након инокулације, садржај биомасе у примењеном медијуму износи 0,08 g/l. Након благог пораста у току првих 8 часова и вредности од 0,18 g/l долази до интензивнијег повећања садржаја биомасе, односно уласка примењеног производног микроорганизама у експоненцијалну фазу раста. Експоненцијална фаза раста траје до око 36-ог часа када садржај биомасе износи 2,12 g/l, након чега наступа период успоравања раста који траје до 44-ог часа и у ком биомаса износи 2,42 g/l. Након 44-ог часа производни микроорганизам улази у стационарну фазу раста и све до краја процеса нема значајних промена садржаја биомасе, која у 96-ом часу износи 2,55 g/l. Током биосинтезе ксантана долази до константног смањења садржаја извора угљеника, са почетног садржаја који износи 29,78 g/l на вредност од 4,94 g/l. Такође, резултати показују да након 60-ог часа биосинтезе долази до веома благог смањења садржаја извора угљеника, за 1,83 g/l. Садржај ксантана у анализираној култивационој течности је у 4-ом часу биосинтезе веома низак и износи 0,33 g/l. Након 4-ог часа биосинтезе долази до константног повећања садржаја жељеног производа све до 52-ог часа, када достиже вредност од 21,36 g/l. Након 52-ог часа до краја биопроцеса садржај ксантана благо расте и у 96-ом часу износи 23,13 g/l.

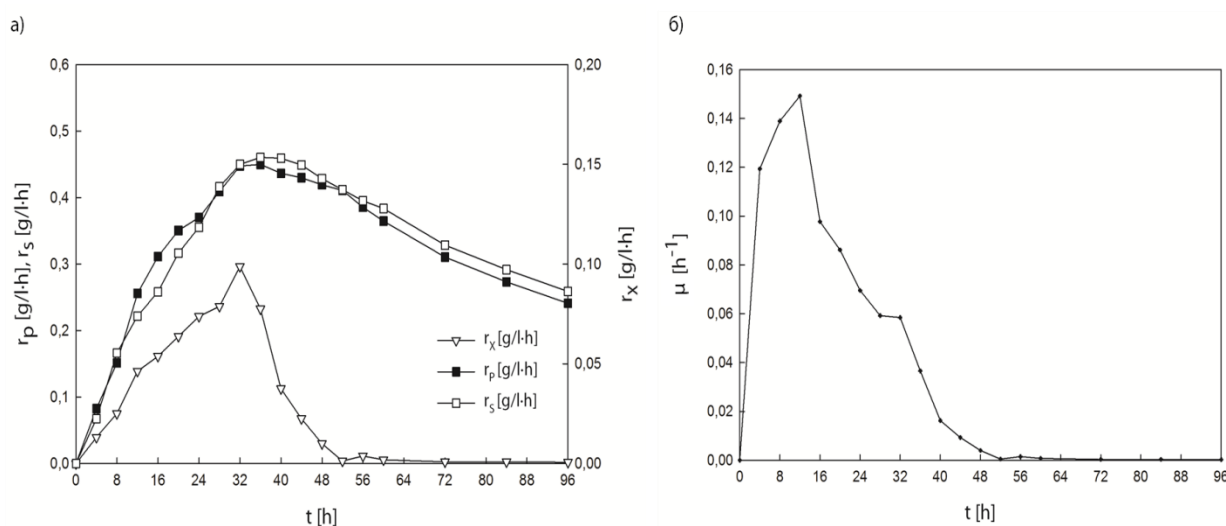


Слика 5.51. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

Такође, резултати показују да након 60-ог часа биосинтезе долази до веома благог смањења садржаја извора угљеника, за 1,83 g/l. Садржај ксантана у анализираној култивационој течности је у 4-ом часу биосинтезе веома низак и износи 0,33 g/l. Након 4-ог часа биосинтезе долази до константног повећања садржаја жељеног производа све до 52-ог часа, када достиже вредност од 21,36 g/l. Након 52-ог часа до краја биопроцеса садржај ксантана благо расте и у 96-ом часу износи 23,13 g/l.

Добијена вредност привидног вискозитета култивационе течности износи 154,21 mPa·s, док су вредности азота и фосфора на крају биосинтезе применом отпадне воде из производње вина као основе култивационог медијума износиле 0,022 g/l и 0,0045 g/l, редоследом. Добијене вредности резидуалних нутријената су ниже у поређењу са вредностима истих параметара који су добијени извођењем биосинтезе на оптимизованој подлози са глукозом на основу чега се може закључити да је на медијуму са ефлуентом утрошено више ових нутријената.

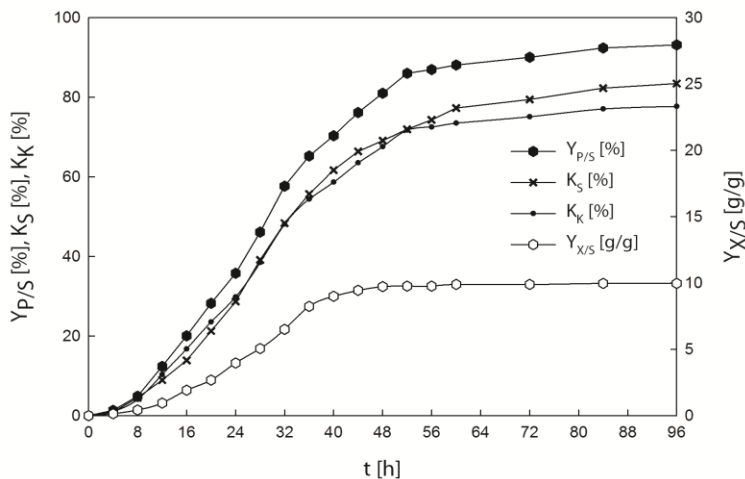
Зависност брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника и брзине производње биомасе, као и специфичне брзине раста од времена трајања биосинтезе ксантана применом медијума који као основу садржи отпадну воду из производње вина приказана је на слици 5.52. Са слике 5.52.а. може се уочити да је брзина настајања биомасе константно расла до 32-ог часа биосинтезе и максималне вредности од 0,098 g/l·h након чега се у наредних 10 часова смањује и достиже вредност од 0,001 g/l·h. Након 52-ог часа биосинтезе брзина настајања биомасе остаје готово непромењена и све до краја биопроцеса има вредности блиске нули. Брзина настајања производа и брзина потрошње супстрата интензивно расту све до 36-ог часа биосинтезе када достижу своје максималне вредности од 0,45 g/l·h и 0,46 g/l·h, редоследом. Између 36-ог и 96-ог часа вредности брзина настајања производа и потрошње извора угљеника се константно и уједначено смањују до крајњих вредности од 0,24 g/l·h и 0,26 g/l·h, редоследом.



Слика 5.52. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

Зависност специфичне брзине раста примењеног производног микроорганизма од времена биосинтезе је приказана на слици 5.52.б. Непосредно након почетка биопроцеса долази до интензивног пораста вредности специфичне брзине раста која своју максималну вредност остварује у 12-ом часу и која износи 0,149 h⁻¹. Након интензивног пада вредности у наредна 4 часа, на вредност од 0,098 h⁻¹ специфична брзина раста наставља благо да опада све до 52-ог часа када достиже вредност блиску нули која остаје непромењена све до краја биосинтезе.

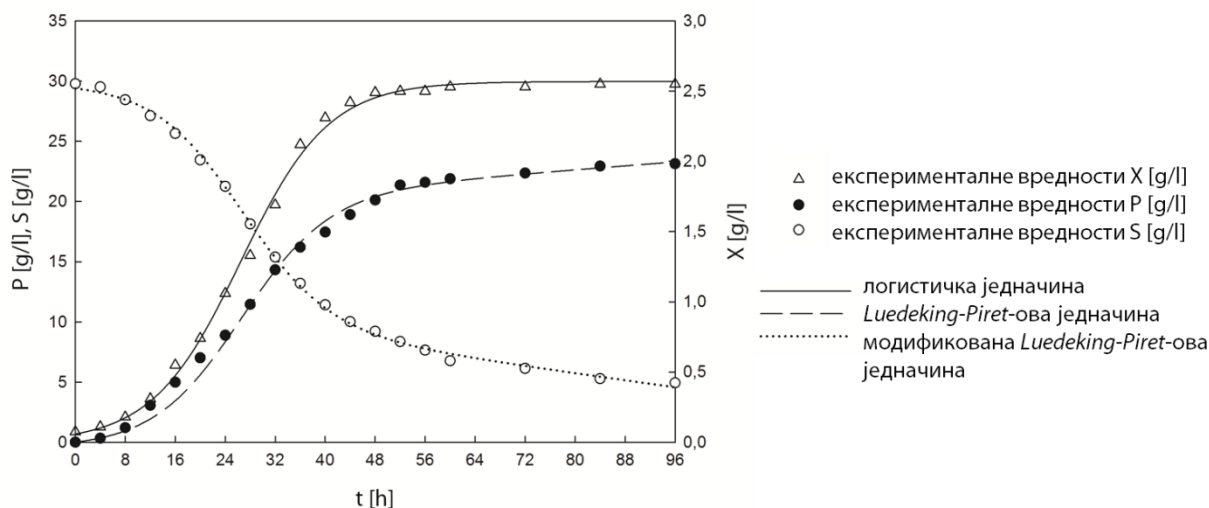
На слици 5.53. приказана је промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током 96 часова биосинтезе ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње вина.



Слика 5.53. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

Коефицијент приноса биомасе у односу на супстрат расте до 48-ог часа биосинтезе и достиже вредност од 9,72 g/g, која се до краја биопроцеса веома благо мења и на крају износи 9,96 g/g. Добијени резултати показују да вредности приноса производа у односу на супстрат, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан расту током читавог процеса производње ксантана, уз достизање максималних вредности од 93,11%, 83,41% и 77,67%, редоследом, на крају биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина.

На слици 5.54. приказани су резултати који описују кинетику умножавања биомасе (X), кинетику настајања производа (P) и кинетику потрошње извора угљеника (S) током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из винарије, односно приказане су измерене експерименталне вредности и криве добијене њиховим фитовањем у предложене кинетичке моделе применом одговарајућег софтверског пакета. Поред тога, експериментално одређене вредности кинетичких параметара и вредности које предвиђају примењени модели су приказане у табели 5.44.



Слика 5.54. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

Табела 5.44. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње вина

параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X_0 [g/l]	$0,0587 \pm 0,0076$	$0,08 \pm 0,01$
X_m [g/l]	$2,5680 \pm 0,0205$	$2,55 \pm 0,05$
μ_m [h^{-1}]	$0,1420 \pm 0,0051$	0,149
α [gP/gX]	$8,1505 \pm 0,1758$	8,932
β [gP/gX·h]	$0,0159 \pm 0,0046$	0,0184
S_0 [g/l]	$29,3825 \pm 0,1435$	$29,78 \pm 0,47$
γ [gS/gX]	$7,8762 \pm 0,1193$	7,8356
δ [gS/gX·h]	$0,0284 \pm 0,0022$	0,043

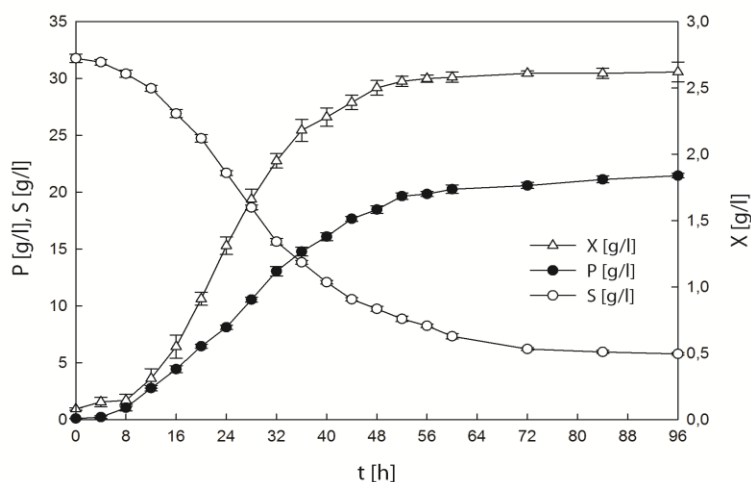
Експериментално одређена вредност почетног садржаја биомасе износи 0,0587 g/l, док је вредност предвиђена моделом релативно блиска и износи 0,08 g/l. Поред тога, предвиђене вредности максималне специфичне брзине раста ($\mu_m = 0,1420 h^{-1}$) и максималног садржаја биомасе ($X_m = 2,5680 g/l$) се веома добро поклапају са експериментално одређеним вредностима ($\mu_m = 0,149 h^{-1}$ и $X_m = 2,55 g/l$). За предложени кинетички модел вредност R^2 износи 0,9978 и упоређивањем експериментално одређених и моделом предвиђених података добијених култивацијом у примењеним експерименталним условима показано је да се логистичка једначина може применити за описивање раста бактерије *Xanthomonas campestris*.

За описивање производње ксантана и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње вина и добијање кинетичких параметара, примењене су *Luedeking-Piret*-ова једначина и модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина, редоследом. Добијени резултати су приказани на слици 5.54. и у табели 5.44. и показују одлично слагање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности свих параметара, осим мале разлике вредности параметра δ , који представља константу која није повезана са растом у моделу који описује кинетику потрошње извора угљеника, за који експериментално добијена вредност износи 0,043 gS/gX·h док је вредност предвиђена моделом 0,0284 gS/gX·h. Фитовањем експерименталних вредности одабраним моделима, односно *Luedeking-Piret*-овом и модификованом *Luedeking-Piret*-овом једначином, добијене вредности статистичког показатеља исправности модела износе 0,9940 и 0,9989, редоследом. Добијени резултати указују да су примењени модели адекватни за описивање кинетике настајања производа и кинетике потрошње супстрата у примењеним експерименталним условима.

5.3.4.6. Кинетика биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

Промене садржаја биомасе, извора угљеника и производа током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера приказани су на слици 5.55. Садржај биомасе у првих 8 часова биосинтезе се благо повећава са 0,08 g/l на 0,15 g/l, након чега долази до интензивнијег пораста ове вредности и постизања садржаја биомасе од 2,50 g/l, у 48-ом часу биосинтезе. Даља промена садржаја биомасе је незнатна и између 48-ог и 96-ог часа биосинтезе вредности садржаја биомасе указују да се

производни микроорганизам налази у стационарној фази раста. На крају биосинтезе садржај биомасе износи 2,62 g/l. Током производње ксантана, са резултата приказаних на слици 5.55, може се уочити смањење садржаја извора угљеника са почетних 31,77 g/l на 5,78 g/l у 96-ом часу. Након благог смањења током првих 8 часова, потрошња извора угљеника постаје интензивнија

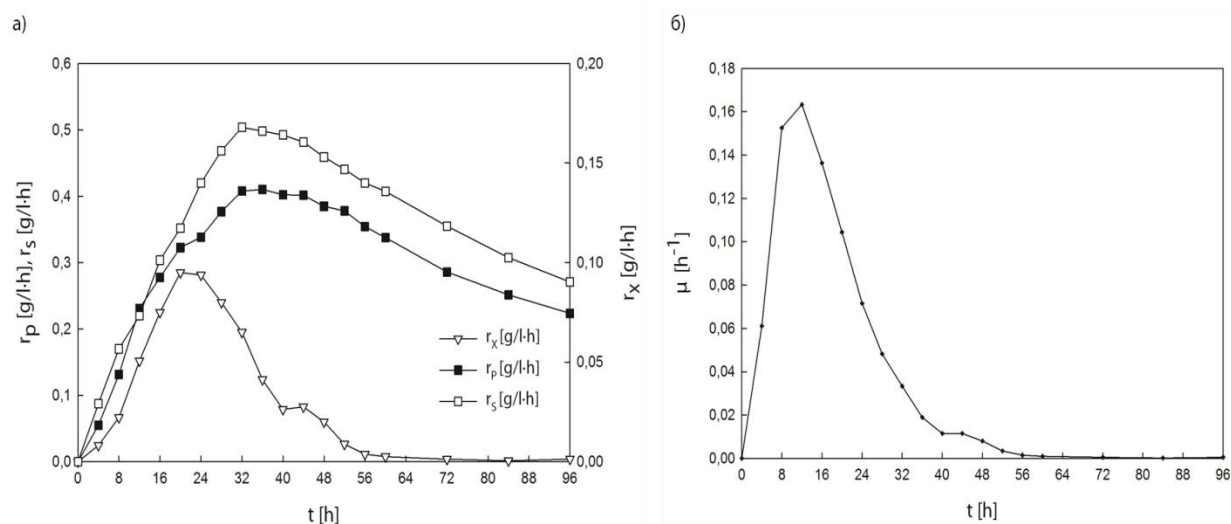


Слика 5.55. Ток биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

и у периоду између 8-ог и 60-ог часа биосинтезе вредност садржаја извора угљеника се смањује са 30,41 g/l на 7,33 g/l, након чега се до краја биосинтезе смањује блажим интензитетом. Садржај ксантана расте константно током свих 96 часова. У првих 8 часова та промена је блага и достиже вредност од 1,05 g/l, након чега је, до 60-ог часа, интензитет синтезе повећан и достиже 20,29 g/l. Након 60-ог часа па до краја биосинтезе уочава се благи пораст садржаја ксантана до 21,45 g/l.

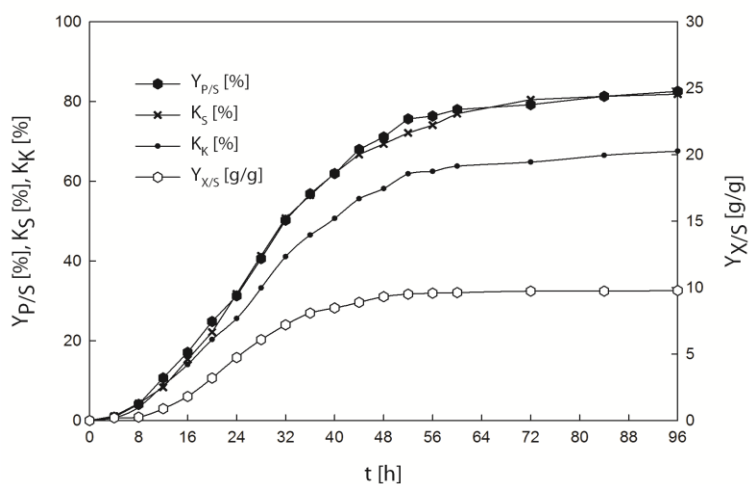
Вредности привидног вискозитета култивационе течности, садржаји азота и фосфора, одређене на крају биопроцеса износе 151,31 mPa·s, 0,035 g/l и 0,0045 g/l, редоследом. Добијене вредности показатеља успешности биосинтезе ксантана имају вредности које су веома блиске вредностима истих показатеља добијеним након биосинтезе ксантана применом оптимизоване подлоге са глукозом у увећаним размерама.

Брзине производње ксантана и биомасе, као и брзина потрошње извора угљеника током процеса биосинтезе ксантана применом култивационог медијума који као основу садржи отпадну воду из производње шећера су приказане на слици 5.56.а. Добијени резултати показују да је брзина настајања биомасе расла до 20-ог часа биосинтезе када достиже своју максималну вредност од 0,095 g/l·h, након чега у даљем току биосинтезе долази до смањивања ове вредности, на вредност блиску нули у 56-ом часу биосинтезе и одржавања те вредности све до краја биопроцеса. Брзина потрошње супстрата и брзина настајања производа почињу да расту непосредно након инокулације и достижу своје максималне вредности у 32-ом, односно 36-ом часу биосинтезе, које износе 0,41 g/l·h и 0,50 g/l·h, редоследом. Након тога вредности брзина се смањују до краја биосинтезе када брзина потрошње супстрата износи 0,27 g/l·h, а брзине настајања производа 0,22 g/l·h. На слици 5.56.б. приказана је зависност специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера. Резултати показују да специфична брзина раста интензивно расте до 16-ог часа биосинтезе, када достиже своју максималну вредност која износи 0,163 h⁻¹, а потом опада до вредности од 0,12 h⁻¹ у 40-ом часу и даље до вредности блиске нули у 56-ом часу биосинтезе. Након тога, до краја биосинтезе ксантана специфична брзина раста има вредности блиске нули.



Слика 5.56. Зависност (а) брзине производње ксантана, брзине потрошње извора угљеника, брзине настајања биомасе и (б) специфичне брзине раста од времена биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

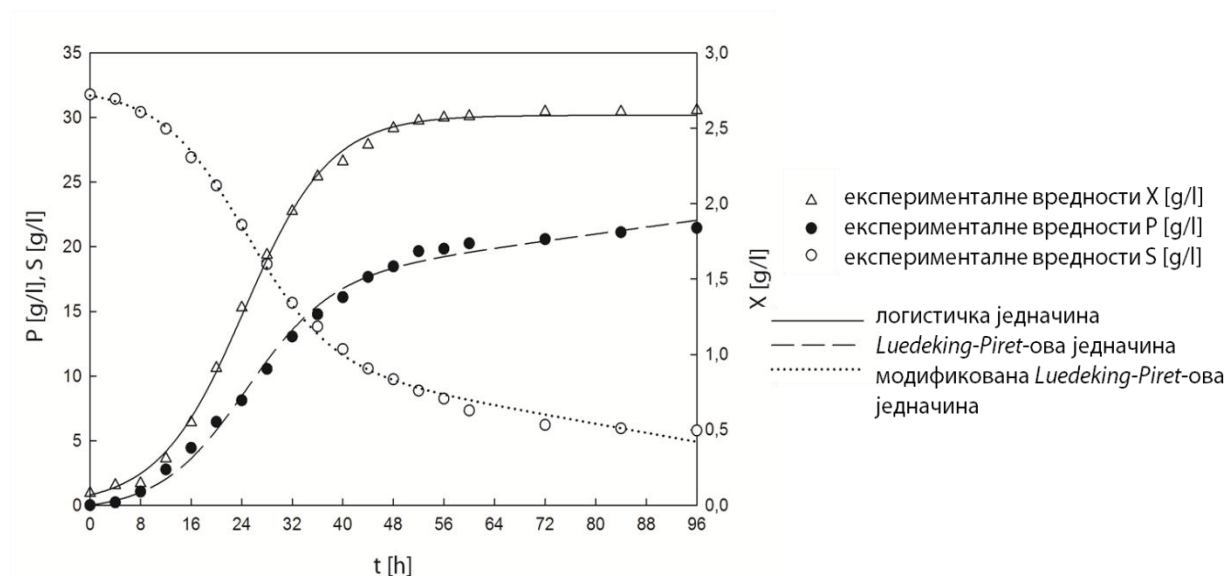
На слици 5.57. приказана је промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, као и степен конверзије извора угљеника и степен конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера. Коефицијент приноса биомасе у односу на супстрат током првих 8 часова биосинтезе се благо повећава, до вредности од 0,25 g/g, након чега долази до његовог интензивнијег пораста све до 48-ог часа биосинтезе и достизања вредности од 9,31 g/g. Након 48-ог часа, све до краја биосинтезе, вредност коефицијента приноса биомасе веома благо расте и достиже 9,77 g/g. Коефицијент приноса производа у односу на супстрат и коефицијент конверзије извора угљеника имају блиске вредности и сличан тренд током трајања биосинтезе.



Слика 5.57. Промена коефицијента приноса ксантана, коефицијента приноса биомасе, степена конверзије извора угљеника и степена конверзије извора угљеника у ксантан током биосинтезе на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

До 56-ог часа уочава се интензиван пораст њихових вредности, до 76,34% и 74,03%, редоследом. Након 56-ог часа па до краја биопроцеса, уочава се благи пораст коефицијента приноса производа у односу на супстрат и степена конверзије извора угљеника, до вредности од 82,53% и 81,80%, редоследом. Током свих 96 часова биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера, долази до пораста степена конверзије извора угљеника у ксантан који у 96-ом часу достиже вредност од 67,52%.

На слици 5.58. приказана је кинетика настајања биомасе (X), синтезе производа (P) и кинетика нестајања извора угљеника (S) током биосинтезе ксантана на медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера, односно приказане су измерене експерименталне вредности и криве добијене њиховим фитовањем у предложене кинетичке моделе применом софтверског пакета SigmaPlot®11. Поред тога, експериментално одређене вредности кинетичких параметара и вредности које предвиђају примењени модели су приказане у табели 5.45.



Слика 5.58. Кинетика умножавања биомасе, настајања производа и потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

За фитовање експерименталних података садржаја биомасе примењена је логистичка једначина и моделом предвиђене вредности почетног садржаја биомасе, максималног садржаја биомасе и максималне специфичне брзине раста износе 0,0682 g/l, 2,5856 g/l и 0,1479 h⁻¹, редоследом. Добијени резултати показују веома добро слагање са експериментално израчунатим вредностима ових параметара који имају вредности од 0,08 g/l, 2,62 g/l и 0,163 h⁻¹, редоследом. Такође, веома висока вредност R² која износи 0,9987 указује да примењени модел одлично описује понашање односно раст примењеног производног микроорганизма на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера.

Табела 5.45. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационом медијуму са отпадном водом из производње шећера

параметар	моделом предвиђене вредности	експериментално одређене вредности
X ₀ [g/l]	0,0682 ± 0,0067	0,08 ± 0,01
X _m [g/l]	2,5856 ± 0,0153	2,62 ± 0,07
μ _m [h ⁻¹]	0,1479 ± 0,0042	0,163
α [gP/gX]	6,8730 ± 0,1377	6,7143
β [gP/gX·h]	0,0257 ± 0,0035	0,019
S ₀ [g/l]	31,6839 ± 0,2049	31,77 ± 0,37
γ [gS/gX]	8,1725 ± 0,1618	7,1731
δ [gS/gX·h]	0,0336 ± 0,0029	0,039

Luedeking-Piret-ова једначина је примењена за описивање кинетике настајања производа током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера и резултати фитовања добијених експерименталних вредности садржаја ксантана са овим моделом су приказани на слици 5.58. и у табели 5.45. Добијени резултати показују да су вредности предвиђене примењеним моделом за параметар α и параметар β и који износе 6,8730 gP/gX и 0,0257 gP/gX·h, редоследом, веома блиске експериментално одређеним вредностима истих, 6,7143 gP/gX и 0,019 gP/gX·h, редоследом. Одлично поклапање експериментално добијених и моделом предвиђених вредности, као и чињеница да добијена вредност R^2 износи 0,9954 показују да се *Luedeking-Piret*-ов модел може применити за описивање производње ксантана у примењеним експерименталним условима.

За описивање кинетике потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана примењена је модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина и резултати фитовања експерименталних резултата садржаја извора угљеника са овим моделом су приказани на слици 5.58. и у табели 5.45. Добијени резултати показују да постоји веома добро слагање између експериментално израчунате вредности почетне концентрације извора угљеника од 31,77 g/l и моделом предвиђене вредности истог која износи 31,6839 g/l, као и слагање вредности параметра δ чија експериментална вредност износи 0,039 gS/gX·h, а моделом предвиђена 0,0336 gS/gX·h. Резултати приказани у табели 5.45 указују да једино у случају вредности параметра γ који представља константу која је везана за раст, постоји разлика између експериментално одређене и моделом предвиђене вредности. Добијени резултати, као и вредност R^2 која износи 0,9981 показују да примењена модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина представља одговарајући модел за описивање потрошње извора угљеника током биосинтезе ксантана на култивационом медијуму који као основу садржи отпадну воду из производње шећера.

5.3.4.7. Поређење кинетичких параметара биосинтезе ксантана у увећаним размерама на култивационим медијумима са ефлуентима различитих грана прехранбене индустрије

За адекватно описивање кинетике настајања биомасе и производа и кинетике потрошње супстрата током биопроцеса производње различитих екстрацелуларних полисахарида микроорганизмима као што су *Xanthomonas campestris*, *Aureobasidium pullulans*, *Azotobacter vinelandii* или *Pseudomonas* sp., могу се применити логистички, *Luedeking-Piret*-ов и модификован *Luedeking-Piret*-ов модел. Производња екстрацелуларних полисахарида може да буде зависна од раста (пуллан и алгинат), независна од раста (биополимер из *Pseudomonas* sp.) или истовремено и зависна и независна од раста (ксантан) (Serrano-Carreón et al., 1997).

Резултати добијени у оквиру ове дисертације и приказани у овом поглављу (поглавље 5.3.4.) потврђују да се у примењеним експерименталним условима логистичка, *Luedeking-Piret*-ова и модификована *Luedeking-Piret*-ова једначина могу користити за адекватно описивање кинетике биопроцеса производње ксантана применом ефлуената различитих грана прехранбене индустрије као основе култивационог медијума.

Резултати кинетичких параметара добијени фитовањем експерименталних резултата са горенаведеним моделима су са циљем једноставнијег поређења збирно приказани у табели 5.46.

Табела 5.46. Вредности кинетичких параметара биосинтезе ксантана на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије и на оптимизованој подлози са глукозом

	подлога са глукозом	култивациони медијум са отпадном водом из производње:				
		кекса	алкохола на меласи	пива	вина	шећера
X_0 [g/l]	0,0715	0,0667	0,0493	0,0712	0,0587	0,0682
X_m [g/l]	2,6464	2,4186	2,4382	2,7081	2,568	2,5856
μ_m [h ⁻¹]	0,1462	0,1418	0,1594	0,1364	0,142	0,1479
α [gP/gX]	8,5838	8,506	8,3089	8,7971	8,1505	6,873
β [gP/gX·h]	0,0236	0,0227	0,0312	0,0127	0,0159	0,0257
S_0 [g/l]	30,4846	28,3088	31,9798	31,0369	29,3825	31,6839
γ [gS/gX]	7,1808	7,4476	8,6726	8,4216	7,8762	8,1725
δ [gS/gX·h]	0,0479	0,0432	0,0419	0,0238	0,0284	0,0336

С обзиром да физиолошко стање у ком се микроорганизам налази има велики утицај на успешност целокупног биопроцеса веома је значајна припрема инокулума (García-Ochoa et al., 1995). Приближне вредности почетне концентрације биомасе (0,0493-0,0712 g/l) указују да је у примењеним експерименталним условима инокулум био уједначен услед вишеструког пасажирања приликом припреме, што је предложено од стране многих аутора (Moraine and Rogovin, 1971; Pons et al., 1990; García-Ochoa et al., 1995). Такође, добијене вредности почетне концентрације биомасе имају приближне или донекле више вредности у поређењу са концентрацијом коју су добили García-Ochoa и сарадници (1995) а која износи 0,053-0,060 g/l.

Максималне вредности концентрације биомасе добијене применом отпадних вода као основе култивационог медијума се налазе у опсегу 2,4186-2,7081 g/l, док је вредност максималне концентрације биомасе добијене применом полусинтетичке подлоге са глукозом 2,6464 g/l. Овим је потврђено да ни једна од отпадних вода, примењена за припрему култивационог медијума не садржи супстанце са инхибиторним деловањем на метаболизам производног микроорганизма. Поред тога, добијене вредности су веома блиске вредностима у другим публикованим радовима (Weiss and Ollis, 1980; Pinches and Pallent, 1986).

Добијени резултати показују да максимална специфична брзина раста има приближно исте вредности применом свих анализираних култивационих медијума (0,1364-0,1594 h⁻¹), односно вредности специфичне брзине раста су веома блиске када се раст биомасе односно биосинтеза производа изводи при истим условима (Gilani et al., 2011b).

Параметри који зависе од раста (α и γ) су за два реда величине већи у поређењу са параметрима који не зависе од раста (β и δ). Вредности параметра који зависи од раста α , у моделу који описује настајање ксантана износе 6,873-8,791 gP/gX, док су вредности параметра β значајно ниже и износе 0,023-0,0312 gP/gX·h. Такође, вредности параметра који зависи од раста γ , у моделу који описује потрошњу извора угљеника износе 7,1808-8,6726 gS/gX, док су вредности параметра δ значајно ниже 0,00238-0,0479 gS/gX·h. На основу добијених резултата може се закључити да производња ксантана и потрошња извора угљеника у великој мери зависе од раста производног микроорганизма. Слични резултати су добијени и у истраживањима других аутора (García-Ochoa et al., 1990; Liakopoulou-Kyriakides et al., 1997; Gilani et al., 2011b).

Уколико се добијени резултати свих кинетичких параметара упореде са резултатима доступним у литератури може се видети да између њих постоје одређене сличности али и значајне разлике. Weiss и Ollis (1980) и Pinches и Pallent (1986) су у својим истраживањима применили исти производни микроорганизам, али различите садржаје глукозе и оперативне услове услед чега су се добијене вредности кинетичких параметара разликовале. Поред тога, Serrano-Carreon и сарадници (1998) и Garcia-Ochoa и сарадници (1995) су применили исти почетни садржај сахарозе, али различите изворе азота што је резултовало у значаним разликама кинетичких параметара. Другим речима, кинетички параметари зависе од примењеног производног микроорганизма, састава култивационог медијума и услова производње, услед чега је неопходно одређивање њихових вредности на основу експерименталних података за конкретне услове (Serrano-Carreon et al., 1997; Luong et al., 1988). Управо из ових разлога је једино оправдано испитивати кинетику при оптималним условима састава подлоге, инокулума, процесних параметара и услова.

На основу добијених резултата кинетичког моделовања, односно одређивања кинетичких параметара биопроцеса производње ксантана, може се видети да применом култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде из различитих грана прехранбене индустрије, не постоје значајне разлике у њиховим вредностима. Међутим, у индустријским условима ове мале разлике могу допринети значајним разликама у економским параметрима биопроцеса, те су даља истраживања усмерена ка испитивању ових параметара.

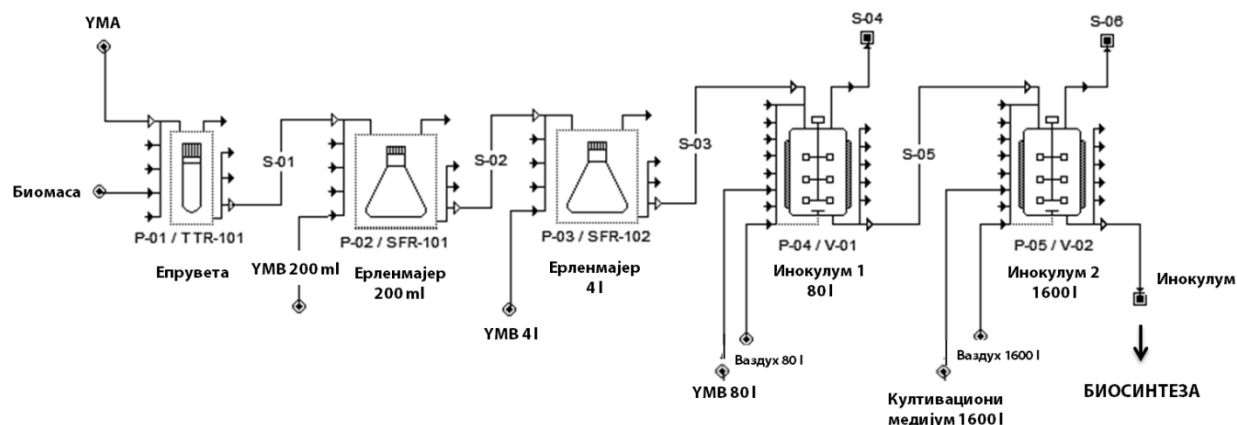
5.3.5. СИМУЛАЦИЈА ПРОЦЕСА БИОСИНТЕЗЕ КСАНТАНА НА КУЛТИВАЦИОНИМ МЕДИЈУМИМА СА ЕФЛУЕНТИМА ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ

Симулација модела биопроцеса производње ксантана на култивационим медијумима који као основу садржи отпадне воде из различитих грана прехранбене индустрије је изведена применом резултата који су добијени у претходном поглављу (поглавље 5.3.4), конкретно применом кинетичких модела и кинетичких параметра који описују настајање биомасе, биосинтезу ксантана и потрошњу извора угљеника. С обзиром да је показано да се биопроцеси на култивационим медијумима са отпадним водама из различитих грана прехранбене индустрије понашају по истој кинетици као и биосинтеза на полусинтетичкој подлози са глукозом, односно могуће их је описати истим кинетичким моделима, добијени кинетички параметри су искоришћени у развијеном моделу биопроцеса производње ксантана (слика 5.14) на основу ког је дата процена успешности примене ових отпадних ефлуената уместо полусинтетичке подлоге са глукозом приликом биотехнолошке производње ксантана.

Дефинисан модел биопроцеса производње ксантана применом отпадних ефлуената, приказан на слици 5.14, је употребљен и за опис производње ксантана применом култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде из кондиторске индустрије, конкретно производње кекса, индустрије производње алкохола на меласи, пива, вина и шећера, као и производње на оптимизованој подлози са глукозом. У даљем тексту, ради могућности детаљнијег и свеобухватнијег објашњења, дијаграм тока биопроцеса производње ксантана је приказан по сегментима који обухватају припрему инокулума, биосинтезу, биосепарацију и управљање споредним производима, а који су приказани на сликама 5.59, 5.60, 5.62 и 5.63, редоследом.

С обзиром да је симулација модела изведена применом шест одабраних култивационих медијума, у вредностима параметара опреме и одређених операција су се јавиле мале разлике, управо као резултат примене култивационих медијума различитих карактеристика. Међутим, значајност ових разлика је незнатна и управо зато је и занемарена, а добијени резултати су приказани као просечне вредности.

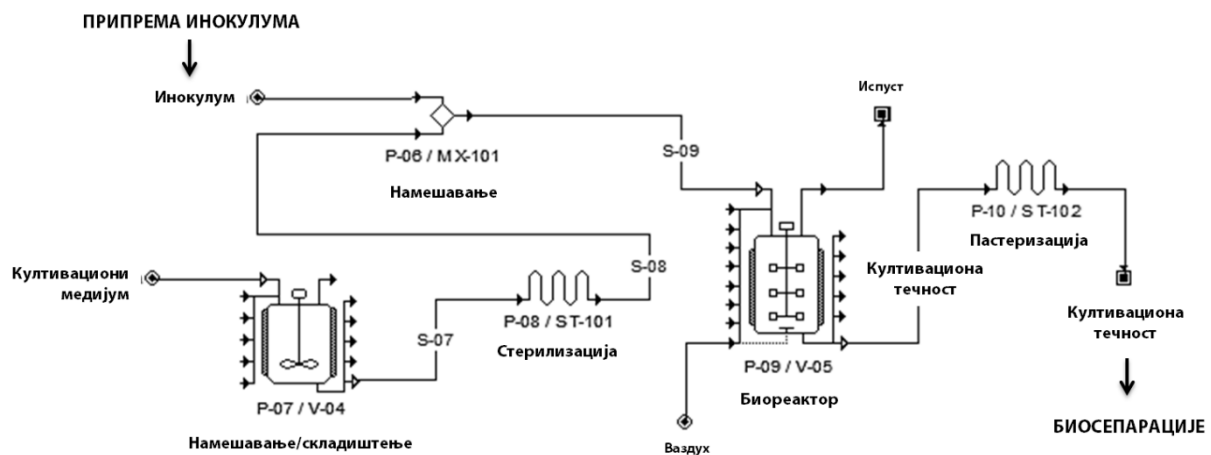
На слици 5.59. приказан је сегмент припреме инокулума са дијаграма тока биопроцеса производње ксантана (слика 5.14) који започиње у лабораторијским условима освежавањем биомасе примењеног производног микроорганизма у епрувети (P-01) на одговарајућој хранљивој подлози (YMA), а потом његовим умножавањем у одговарајућим судовима, прво на лабораторијском (ерленмајери P-02 и P-03 са 200 ml и 4 l YMB медијума), а потом и индустријском нивоу (биореактори P-04 (запремина 110 l, висина 1 m и пречник 0,356 m) и P-05 (запремина 2000 l, висина 2,8 m и пречник 0,95 m) са 80 l YMB медијума и 1600 l култивационог медијума, редоследом). Свака фаза припреме инокулума трајала је 24 часа на температури од 26°C и количина добијеног инокулума је подешена тако да задовољи услов који захтева да је за инокулацију култивационог медијума приликом производње ксантана потребно између 5 и 10% инокулума производног микроорганизма (Додић и Граховац, 2013). За потребе биокатализатора у лабораторијским условима аерација је вршена спонтано, док је садржај биореактора P-04 и P-05 аерисан стерилним ваздухом са протоком од 1 l/min. Потрошња снаге за мешање садржаја ова два биореактора износи 0,25 и 4,75 kW. Као средство за хлађење у моделу је коришћена расхладна вода улазне температуре 5°C, а излазне 10°C, при чему је њен проток 42,75 kg/h и 806,30 kg/h за биореактор P-04 и P-05, редоследом.



Слика 5.59. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана
– сегмент припреме инокулума

Након сегмента који описује припрему инокулума, следи сегмент биосинтезе ксантана применом отпадних ефлуената из различитих грана прехранбене индустрије као основе култивационог медијума, који је приказан на слици 5.60. Поред конкретне биореакције која се одвија у биореактору (P-09), овај сегмент модела биопроцеса производње ксантана се састоји од припреме култивационог медијума (P-07), његове стерилизације (P-08), намешавања са инокулумом припремљеним у претходном сегменту модела (P-06), као и пастеризације култивационе течности добијене након биореакције (P-10), а са циљем инактивације фитопатогеног производног микроорганизма.

Као култивациони медијум за производњу ксантана користи се или полусинтетичка подлога са глукозом или је његова основа једна од одабраних отпадних вода (отпадна вода из производње кекса, алкохола на меласи, пива, вина или шећера). Количина култивационог медијума који се налази у суду за намешавање, односно складиштење износи 20000 l, што представља количину која је потребна за једну шаржу, а добијена је проценом, на основу односа доступне количине испитаних отпадних вода на годишњем нивоу и могућег броја шаржи датог модела постројења.



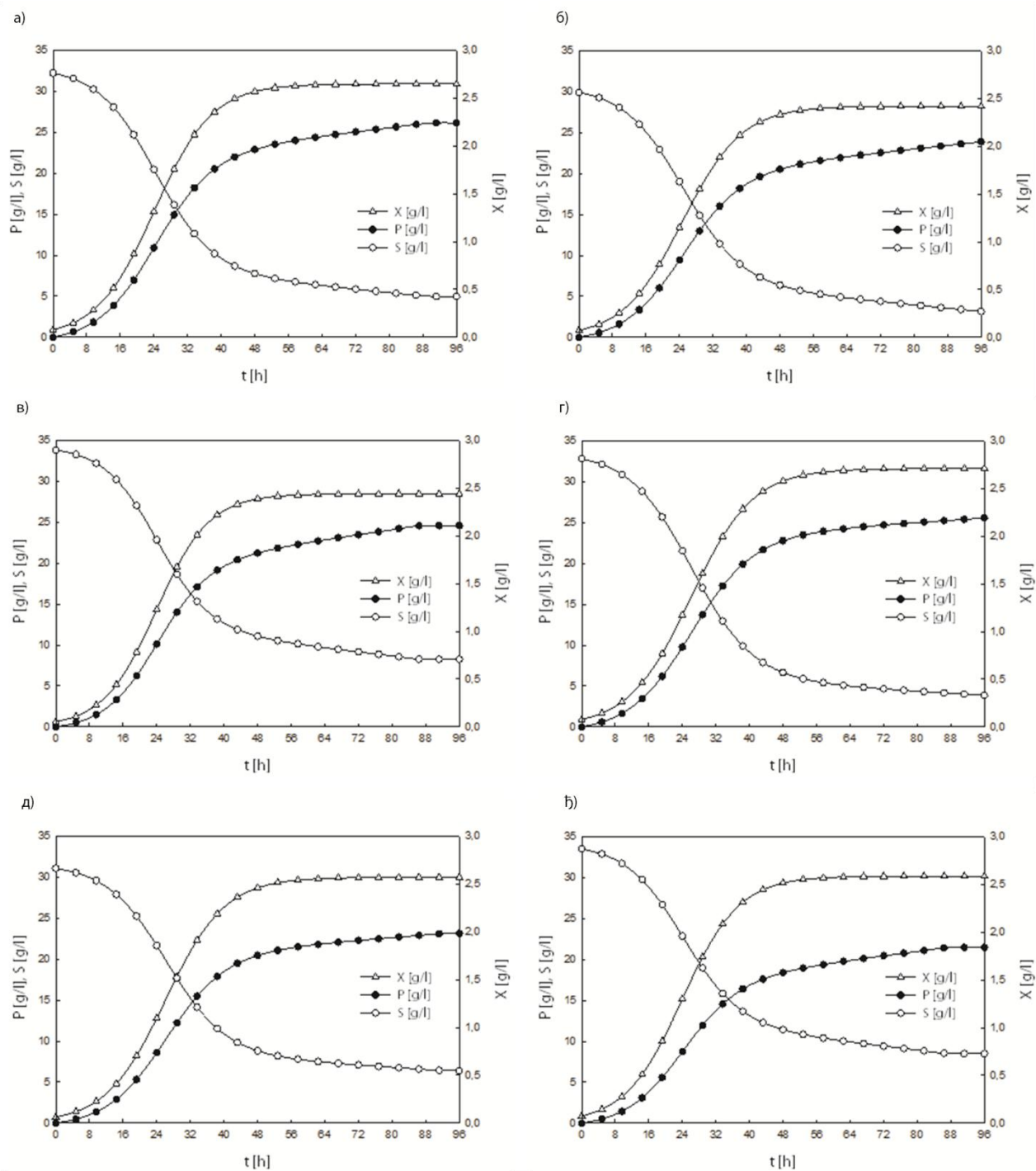
Слика 5.60. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент биосинтезе

У суду за намешавање (P-07) односно складиштење (висина 6,214 m и пречник 2,071 m) врши се припрема култивационог медијума (снага мешања 1,885 kW, трајање 30 min), уколико је то потребно врши се обогаћивање или разблаживање до потребних количина извора угљеника, азота и фосфора, а на основу вредности добијених након анализе примењених отпадних вода. Након формулације, култивациони медијум се шаље на стерилизацију (P-08; проток 56500 l/h) воденом паром чији је проток 1260 kg/h и температура 152°C, при чему је пречник цеви у зони задржавања 1,60 m, а дужина цеви у зони задржавања 12,20 m. Стерилизација се изводи на температури од 121°C у трајању од 20 min, при чему је излазна температура култивационог медијума 35°C, а хлади се водом (улазна температура 25°C, излазна температура 30°C). Након стерилизације, култивациони медијум се намешава (P-06; проток 20500 kg/h) са инокулумом добијеним у претходном сегменту модела биопроцеса и шаље у биореактор (P-09) (висина 6,66 m, пречник 2,20 m) у ком се врши биореакција. Радна запремина у биореактору износи 20600 l, биореакција траје 96 часова, на температури од 30°C, аерацији 2 l/l·min, при чему утрошена снага за мешање износи 61,50 kW. За хлађење биореактора употребљена је вода, чији је проток 10720 kg/h (улазна температура 5°C, излазна температура 10°C). Након биореакције, култивациона течност се пастеризује (P-10, проток око 20600 l/h) на температури од 100°C у трајању од 60 min, при чему је излазна температура култивационог медијума 35°C, а за хлађење биореактора се користи вода (улазна температура 25°C, излазна температура 30°C).

Састав култивационог медијума (S-09) након намешавања (P-06) са инокулумом, односно пре биореакције, као и састав култивационе течности добијен након биореакције, приказан је у табели 5.47, за сваки култивациони медијум посебно. Добијени резултати (табела 5.47) показују да се вредности добијене у развијеном симулационом моделу, добро слажу са вредностима

почетних и крајњих садржаја биомасе, производа и извора угљеника које су добијене поређењем са експериментално добијеним вредностима и вредностима добијеним кинетичким моделовањем (слика 5.35, 5.39, 5.43, 5.47, 5.51 и 5.55; табела 5.40-5.45).

Такође, добро слагање ових вредности је потврђено графичким приказом резултата симулације за токове култивације применом оптимизоване подлоге са глукозом и култивационих медијума који као основу садрже отпадне воде из производње кекса, алкохола на меласи, пива, вина и шећера, а који су приказани на слици 5.61.



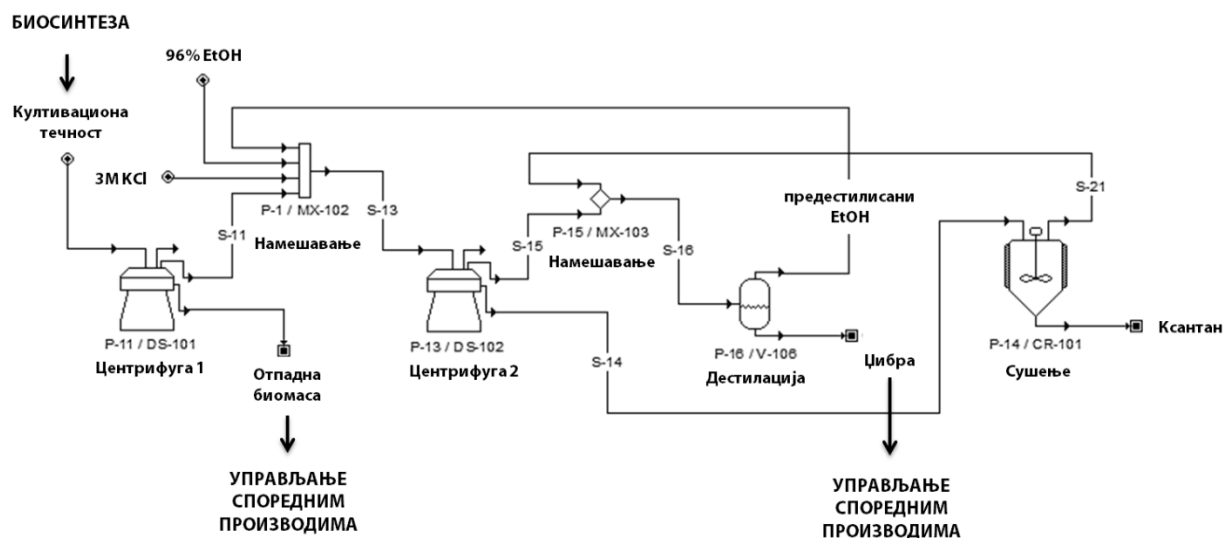
Слика 5.61. Симулација тока биосинтезе ксантана на (а) оптимизованој подлози са глукозом (а), односно на култивационом медијуму са отпадном водом из производње (б) кекса, (в) алкохола на меласи, (г) пива, (д) вина и (ђ) шећера

Табела 5.47. Симулирани састав медијума пре и након биореакције на подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије

састав	подлога са глукозом	медијум који као основу садржи отпадну воду из производње:					
		кекса	алкохола на меласи	пива	вина	шећера	
пре биореакције	X [g/l]	0,072	0,066	0,050	0,071	0,058	0,069
	X [%]	0,0076	0,007	0,0053	0,0076	0,0062	0,0073
	S [g/l]	30,21	28,03	31,70	30,80	29,13	31,40
	S [%]	3,22	2,97	3,38	3,27	3,11	3,33
	остало* [%]	96,77	97,02	96,61	96,72	96,89	96,66
након биореакције	X [g/l]	2,64	2,42	2,44	2,71	2,57	2,58
	X [%]	0,28	0,26	0,26	0,29	0,27	0,26
	S [g/l]	3,64	3,63	5,10	5,12	4,89	5,70
	S [%]	0,39	0,39	0,54	0,54	0,52	0,58
	P [g/l]	26,12	23,98	24,55	25,66	23,14	21,45
	P [%]	2,79	2,54	2,62	2,72	2,47	2,18
остало* [%]	96,54	96,87	96,57	96,45	96,73	96,97	

* остало – вода, производи метаболизма и неизреаговали нутријенти

Култивациона течност добијена након биореакције и инактивације производног микроорганизма пастеризацијом се, у сегменту биосепарација, пречишћава са циљем издвајања готовог производа. Сви поступци и операције који су обухваћени овим сегментом модела биопроцеса производње ксантана су приказани на слици 5.62.



Слика 5.62. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент биосепарације

Прва операција из дефинисаног биосепарационог низа јесте центрифугирање (P-11) култивационе течности са циљем раздвајања течне и чврсте фазе, односно издвајања биомасе производног микроорганизма као чврсте фазе од остатка култивационе течности.

Центрифугирање је изведено са 8 јединица диск центрифуге чији запремински проток по јединици износи 2580 l/h, излазна температура смеше 47°C, а потрошња снаге 551 kW. Издвојена биомаса је даље третирана као споредни производ, док је течна фаза култивационе течности (S-11) намешавана (P-12, проток 363500 kg/h) са етанолом (до концентрације од 60% у смеси) и 3М KCl (до концентарције 1% у смеси) како би дошло до таложења ксантана. Након таложења, добијена смеша се поново центрифугира (P-13) са 7 јединица диск центрифуге чији запремински проток по јединици износи 2541 l/h, како би се у чврстој фази издвојио ксантан. Време трајања центрифугирања износи 240 min, потрошња снаге 454 kW, а температура смеше на излазу је 47,2°C. Добијена угушћена фаза се шаље на сушење у спреј сушницу (P-14) радне запремине 1100 l, висине 2,20 m и пречника 0,88 m. Сушење се изводи на 100°C у трајању од 2 часа, при чему је утрошена снага од 0,12 kW и добијен жељени производ ксантан. Течна фаза добијена након друге центрифуге (S-15) се намешава (P-15, проток 10000 kg/h) са течном фазом која долази из спреј сушнице (S-21) и заједно се шаљу на дестилацију (P-16). Радна запремина примењеног дестилатора износи 1490 l (висина 3,23 m, пречник 0,81 m), док је време задржавања 5 min. За загревање се користи пара температуре 152°C и протока 23500 kg/h. Предестилисани етанол се рециркулише у процесу и користи за поновно таложење ксантана. Остатак који настаје након дестилације представља џибру која се третира као споредни производ.

У табели 5.48. приказан је састав свих значајнијих токова који настају у моделу биопроцеса производње ксантана, на основу којих се могу пратити промене током биопроцеса и међусобно упоредити састави токова добијених применом различитих култивационих медијума. Њихова састав у највећој мери зависи од састава отпадне воде примењене као основе култивационог медијума, али и од саме биореакције, односно од успешности биосинтезе ксантана у примењеним експерименталним условима. Добијени резултати показују да између појединачних токова, добијених након биосинтезе ксантана на одабраним ефлуентима као основи култивационог медијума, не постоје значајне разлике.

Табела 5.48. Симулирани састав токова из сегмента биосепарације добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије

	састав [%]	подлога са глукозом	медијум који као основу садржи отпадну воду из производње:				
			кекса	алкохола на меласи	пива	вина	шећера
течна фаза након центрифуге 1 (S-11)	S	0,39	0,37	0,55	0,54	0,52	0,58
	P	2,80	2,55	2,63	2,72	2,48	2,19
	остало*	96,81	97,07	96,83	96,73	97,00	97,23
течне фазе након центрифуге 2 (S-15)	S	0,13	0,13	0,18	0,18	0,18	0,19
	Et-OH	62,04	61,87	61,97	62,00	61,97	61,85
	KCl	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
	остало*	37,60	37,77	37,62	37,59	37,63	37,73
течна фаза из спреј сушнице (S-21)	Et-OH	62,27	62,09	62,23	62,26	62,22	62,11
	вода	37,74	37,91	31,77	37,74	37,78	37,89
смеша за дестилацију (S-16)	S	0,13	0,12	0,18	0,17	0,17	0,19
	Et-OH	62,05	61,88	61,98	62,01	61,98	61,86
	KCl	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22
	остало*	37,61	37,78	37,63	37,60	37,64	37,74

Табела 5.48 (наставак). Симулирани састав токова из сегмента биосепарације добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије

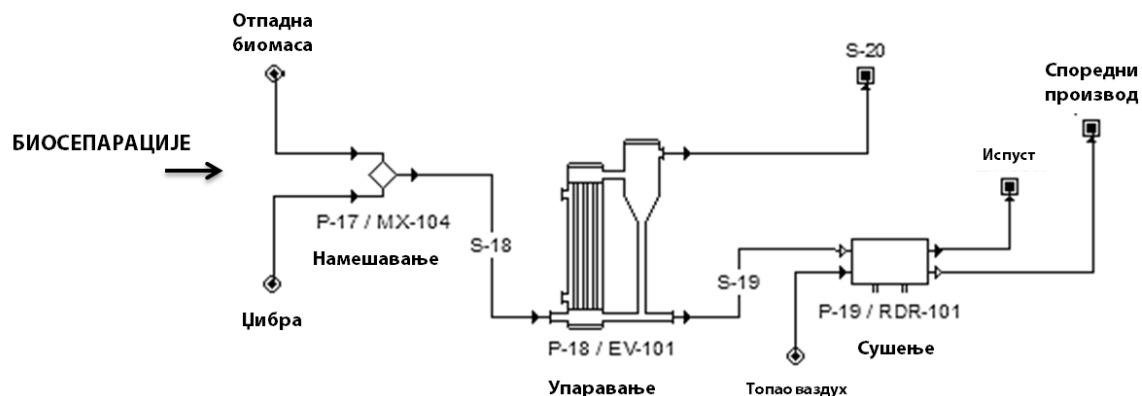
	састав [%]	подлога са глукозом	медијум који као основу садржи отпадну воду из производње:				
			кекса	алкохола на меласи	пива	вина	шећера
чврста фаза након центрифуге 2 (S-14)	S	0,11	0,11	0,15	0,15	0,14	0,16
	P	17,47	17,43	17,46	17,43	17,44	17,25
	Et-OH	51,21	51,09	51,15	51,20	51,15	51,18
	KCl	0,19	0,18	0,19	0,18	0,19	0,18
	остало*	31,03	31,19	31,05	31,04	31,06	31,22
смеша након дестилације	Et-OH	94,18	94,14	94,17	94,17	94,17	94,14
	вода	5,82	5,86	5,83	5,83	5,83	5,86
ксантан	количина**	571,23	523,29	538,83	558,19	507,10	449,57
	чистоћа	93,43	93,42	93,20	93,20	93,23	93,13

* остало – вода, производи метаболизма и неизреаговали нутријенти

** [kg/šarži]

На основу добијених вредности количине (449,57-571,23 kg/šarži) и чистоће (93,13-93,43%) ксантана може се одредити потенцијална примена жељеног производа. Такође, састав смеше након дестилације, односно концентрација добијеног, предестилисаног етанола (94,14-94,18%) који се рециркулише у процесу, утиче на количину етанола коју је потребно додати да би у смеси за таложење постигнута његова одговарајућа концентрација.

У сегменту биосепарација модела биопроцеса производње ксантана описан је поступак издвајања жељеног производа ксантана, али су назначена и места на којима се генеришу и споредни производи, отпадна биомаса, џибра и етанол. Напоменуто је да се етанол рециркулише и поново враћа у процес, док отпадна биомаса и џибра представљају нежељене производе уколико се за њих не пронађе адекватна примена, односно уколико се не дефинише ефикасан начин управљања овим ефлуентима. Део модела биопроцеса производње ксантана који је развијен у оквиру ове докторске дисертације, представља и сегмент управљања добијеним споредним производима, који је приказан на слици 5.63.



Слика 5.63. Дијаграм тока биопроцеса производње ксантана – сегмент управљање споредним производима

Један од могућих начина управљања насталим споредним производима, отпадном бактеријском биомасом и џибром, јесте њихово намешавање (P-17, проток 1950 kg/h), а потом упаравање (P-18) како би се смањила запремина настале смеше и уклонио вишак воде. Капацитет упаривача износи 3220 kg/h, а површина размењивача топлоте је 6,97 m². Примењена пара има проток од 3270 kg/h, температуру од 152°C, а температура излазне смеше износи 40°C. Након упаравања смеша се даље суши у ротационој сушници (P-18), чији капацитет сушења износи 342 kg/h, пречник 1,63 m, дужина 8,12 m и површина бубња 41,90 m². Проток паре која се користи за грејање ваздуха износи 682 kg/h, а температура 152°C.

У табели 5.49. приказан је састав отпадне биомасе, џибре и споредног производа добијеног предложеним поступком управљања споредним производима у моделу биопроцеса производње ксантана. Приказани резултати показују да између ефлуената добијених применом различитих отпадних вода током биосинтезе ксантана и полусинтетичке подлоге са глукозом не постоје значајније разлике. Такође, на основу њиховог састава, а у зависности од потреба и могућности може се предложити неки други начин управљања овим ефлуентима, са циљем добијања производа другачијег квалитета или издвајања одређених компоненти, као што је KCl.

Осушени споредни производ се у зависности од квалитета може користити као сточна храна или ђубриво. Поред тога, један од могућих начина управљања наведеним споредним производима јесте њихова рецикулација у самом биопроцесу производње ксантана, односно употреба смеше добијене намешавањем отпадне биомасе и џибре, уз одговарајуће корекције, али и уз претходну експерименталну потврду на лабораторијском нивоу, као основе култивационог медијума за производњу ксантана.

Табела 5.49. Симулирани састав ефлуената из сегмента управљања споредним производима добијен на полусинтетичкој подлози са глукозом и култивационим медијумима са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије

	састав [%]	подлога са глукозом	медијум који као основу садржи отпадну воду из производње:				
			кекса	алкохола на меласи	пива	вина	шећера
отпадна биомаса	X	17,79	15,69	15,79	15,67	15,79	15,14
	S	0,33	0,33	0,46	0,46	0,44	0,49
	P	2,36	2,15	2,21	2,30	2,09	1,86
	остало*	81,53	81,84	81,55	81,58	81,69	82,51
џибра	S	0,35	0,35	0,49	0,49	0,47	0,53
	Et-OH	3,50	3,48	3,49	3,50	3,49	3,48
	KCl	0,60	0,60	0,60	0,60	0,61	0,60
	остало*	95,54	95,60	95,41	95,41	95,43	95,39
споредни производ	X	20,15	18,76	16,99	18,40	17,96	16,77
	S	26,56	27,90	34,10	33,30	32,91	35,75
	P	3,01	2,57	2,38	2,70	2,37	2,06
	KCl	44,80	45,95	41,09	40,24	41,32	40,34
	остало*	5,48	5,64	5,47	5,37	5,44	5,09
	количина**	286,26	280,21	313,01	319,02	312,05	320,99

* остало – вода, производи метаболизма и неизреаговали нутријенти

** [kg/šarži]

Као резултат симулације, у табели 5.50 је приказана основна економска анализа модела биопроцеса производње ксантана на оптимизованој полусинтеичкој подлози са глукозом, као и на култивационим медијумима који као основу садрже отпадне воде из пет различитих грана прехранбене индустрије и индустрије пића.

С обзиром да је економска анализа развијеног биопроцеса производње ксантана изведена само са циљем поређења вредности потенцијалне цене трошкова производње датог производа, цела процена је базирана само на процени замене полусинтетичке подлоге са глукозом са медијумима на бази отпадних ефлуената. У економској процени, нису узети у обзир инвестициони трошкови, односно претпоставља се да постројење за производњу ксантана већ постоји. Управо из ових разлога, радни капитал и оперативни трошкови имају исте или приближне вредности. Радни капитал за све примењене медијуме износи 16000 \$, осим за медијум на бази отпадне воде из производње пива, где је вредност потребних улагања нешто већа и износи 20000 \$. Такође, оперативни трошкови, који обухватају трошкове комуналија, доступности опреме, радне снаге, лабораторије и др., износе 183000 \$/god, осим за медијум који као основу садржи отпадну воду из производње пива (224000 \$/god). Продуктивност процеса производње ксантана применом оптимизоване подлоге са глукозом износи 44556,06 kg/god, док применом отпадних вода као основе култивационог медијума има нешто ниже вредности и креће се у интервалу 35066,72-43538,84 kg/god. Такође, јединична цена производње жељеног производа је најнижа управо применом оптимизоване полусинтетичке подлоге са глукозом (4,10 \$/kg), док применом одабраних отпадних вода прехранбене индустрије има вредности од 4,35-5,21 \$/kg.

Табела 5.50. Економски показатељи модела биопроцеса производње ксантана применом култивационог медијума са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије или оптимизоване полусинтетичке подлоге са глукозом

	радни капитал [\$]	оперативни трошкови [\$/god]	продуктивност [kg/god]	јединична цена производње [\$/kg]	укупни приходи [\$/god]
оптимизована подлога са глукозом	16000	183000	44556,06	4,10	224000
медијум са отпадном водом из производње кекса	16000	183000	40816,34	4,48	206000
медијум са отпадном водом из производње алкохола на меласи	16000	183000	42028,69	4,35	212000
медијум са отпадном водом из производње пива	20000	224000	43538,84	5,15	219000
медијум са отпадном водом из производње вина	16000	183000	39553,76	4,62	199000
медијум са отпадном водом из производње шећера	16000	183000	35066,72	5,21	177000

Може се уочити, као и у прелиминарним истраживањима симулације, да се трошкови производње ксантана мењају у складу са количином произведеног ксантана по једној шаржи (или на годишњем нивоу), што зависи од доступне количине извора угљеника у култивационом медијуму, односно од врсте и карактеристика отпадне воде.

Добијени резултати показују да иако је производња ксантана најисплативија применом оптимизоване подлоге са глукозом, не постоји велика разлика у поређењу са вредностима добијеним применом отпадних ефлуената као основе култивационог медијума. Када се добијени резултати упореде са вредностима продајне цене ксантана на тржишту, а које износе од 4-5 \$/kg (Li et al., 2016), може се закључити да је применом анализираних отпадних ефлуената који потичу из различитих грана прехрамбене индустрије, осим ефлуената који потичу из производње пива и шећера добијена вредност из овог опсега. Међутим, с обзиром да је развијени модел употребљен првенствено за процену могућности замене полусинтетичке подлоге са глукозом са култивационим медијумима који као основу садрже различите ефлуенте, и то на нивоу биореакције, детаљна техноекономска анализа биопроцеса је неопходна како би се добили потпунији и свеобухватнији резултати економске исплативости процеса.

С обзиром да су дефинисаним симулационим моделом биопроцеса производње ксантана предвиђени на првом месту процесни, али и економски показатељи анализираних биопроцеса, добијени резултати недвосмислено указују на одрживост и економску оправданост производње биополимера ксантана применом отпадних ефлуената различитих грана прехрамбене индустрије. Са технолошког аспекта добијени резултати су поуздан извор информација и као такви представљају основу за дефинисање идејног решења предложеног биотехнолошког процеса, на основу ког је могућа израда главног технолошког пројекта. Поред тога, велики значај има и чињеница да би се добијени резултати могли применити у свим регионима са развијеном прехрамбеном индустријом.

6. ЗАКЉУЧАК

Истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом су проистекла из потребе за решавањем проблема великих количина отпадних вода које генерише прехранбена индустрија у нашем региону, кроз процену могућности њихове примене као основе култивационог медијума у биотехнолошкој производњи биополимера ксантана. Предложеним биотехнолошким процесом се ефлуенти прехранбене индустрије рециклирају, што представља једно од могућих решења проблема загађења животне средине, при чему се на ефикасан и економичан начин добија производ са тржишном вредношћу. Генерисаним симулационим моделом производње ксантана применом отпадних ефлуената различитих грана прехранбене индустрије су предвиђени првенствено процесни, а потом и економски показатељи овог биотехнолошког процеса. Са технолошког аспекта, резултати ових истраживања представљају поуздан извор информација за дефинисање идејног решења предложеног биопроцеса који је основа за израду главног технолошког пројекта.

Специфични закључци изведени на основу истраживања из оквира ове дисертације су:

- На основу резултата добијених у прелиминарним истраживањима, а која су обухватила скрининг могућности примене отпадних вода из производње пива, уља, алкохола, млека, скроба и кондитора, као основе медијума за биотехнолошку производњу ксантана применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, закључено је да све примењене отпадне воде, осим отпадне воде из производње млека, у примењеним експерименталним условима могу бити употребљене у предложеној сврху. Веома високе вредности садржаја ксантана су добијене применом отпадне воде из производње пива (15,56 g/l), уља (14,18 g/l) и применом збирне воде из кондиторске индустрије (10,92 g/l). Постигнути степен конверзије извора угљеника у ксантан од 104,04% у медијуму са отпадном водом из производње уља, израчунат је на основу количине шећера којим је обogaћен култивациони медијум што указује да примењена отпадна вода садржи и друге ферментабилне изворе угљеника чиме је доказано да има изразито погодан састав за биосинтезу ксантана.
- Резултати добијени детаљним испитивањем биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору на ефлуенту из производње јестивог уља као основи култивационог медијума, показали су да постоји велики потенцијал његове примене као сировине у биотехнолошкој производњи жељеног биополимера. Испитивањем успешности овог биопроцеса добијен је садржај ксантана који износи 9,98 g/l, степен конверзије извора угљеника у ксантан од 65,35%, док вредности степена конверзије извора угљеника, азота и фосфора износе 72,80, 56,20 и 73,79%, редоследом. Резултати графичке оптимизације састава медијума који као основу садржи ефлуент из производње уља, са циљем максимизације квалитета и квантитета ксантана, применом методе жељене функције, показали су да је у медијум неопходно додати између 15,00-16,00 g/l одговарајућег извора угљеника, 0,02-0,11 g/l азота, при почетном садржају фосфора од 0,02 g/l. Извођењем биопроцеса производње ксантана на медијуму оптимизованог састава добијене су експерименталне вредности садржаја биомасе, извора угљеника и жељеног производа које су употребљене за одређивање кинетике биосинтезе.

Симулациони модел предложеног поступка производње ксантана, који је развијен на основу дефинисаних кинетичких модела, представља одличну основу за његово даље унапређење и побољшање његове ефикасности.

- Карактеризација примењених ефлуената обухватила је одређивање показатеља квалитета отпадних вода (вредност рН, хемијска и биолошка потрошња кисеоника и садржај суспендованих материја) и показатеља који су од значаја за биотехнолошку производњу (садржај редукујућих материја, укупни и асимилабилни азот, укупни фосфор и садржај минералних материја). Добијени резултати показују да се анализиране отпадне воде које потичу из различитих делова процеса 18 различитих фабрика из више грана прехранбене индустрије и индустрије пића, могу употребити као основа култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана, првенствено као процесна вода и извор минералних материја, а неке и као извор одређених макронутријената.
- Експериментална потврда могућности производње ксантана применом ефлуената различитих грана прехранбене индустрије деловањем производног микроорганизма *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, је добијена извођењем биопроцеса у биореактору стандардних геометријских односа, радне запремине 1,5 l. Ток биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа ефлуенти различитих грана прехранбене индустрије испитан је праћењем динамике потрошње основних макронутријената, а могућност биосинтезе је потврђена на основу вредности реолошких параметара добијених култивационих течности. Додатно, количина добијеног производа на крају биопроцеса, као и вредности конверзије основних макронутријената и вредност конверзије извора угљеника у ксантан употребљене су за процену његове успешности. Највише вредности садржаја синтетисаног ксантана добијене су применом отпадних вода из производње кекса (13,18 g/l), алкохола на меласи (12,98 g/l), пива (12,77 g/l), вина (12,56 g/l) и шећера (12,19 g/l). Такође, применом ових отпадних вода као основе култивационог медијума, степен конверзије извора угљеника у ксантан износи 81,44-85,40%, степен конверзије извора угљеника 72,05-79,20%, степен конверзије азота 59,54-63,96% и степен конверзије фосфора 74,73-81,48%, односно сви показатељи успешности имају веома високе вредности. Поред тога, могућност примене и осталих анализираних отпадних ефлуената као основе медијума за биотехнолошку производњу ксантана, доказана је праћењем динамике потрошње макронутријената, реолошких карактеристика добијених култивационих течности и горенаведених показатеља успешности биосинтезе.
- С обзиром да оптимизација састава медијума представља један од критичних фактора за раст производног микроорганизма и продукцију жељеног производа, за одређивање оптималног садржаја глукозе, азота и фосфора у подлози за производњу ксантана примењена је метода жељене функције. Као једини циљ оптимизације дефинисано је постизање највећег садржаја ксантана у примењеним експерименталним условима. Уз овај услов, максимална вредност жељене функције износи 1,000, за почетни садржај глукозе од 30,56 g/l, азота 0,14 g/l и фосфора 0,03 g/l. При наведеном саставу подлоге, моделом предвиђена вредност садржаја ксантана износи 20,58 g/l, привидног вискозитета култивационих течности 139,12 mPa·s, док вредности резидуалних извора угљеника, азота и фосфора износе 2,79 g/l, 0,045 g/l и 0,012 g/l, редоследом.
- Дефинисање кинетике и развој кинетичких модела који описују умножавања биомасе, настајања производа и потрошњу супстрата је веома значајно за развој биотехнолошког процеса. Убацавањем експерименталних вредности за садржај биомасе, ксантана и извора угљеника у предложене кинетичке моделе за раст биомасе (логистичка једначина), настајање производа (*Luedeking-Piret*-ова једначина) и потрошњу извора угљеника (модификована

Luedeking-Piret-ова једначина), редоследом, добијени су кинетички параметри који описују биосинтезу ксантана применом ефлуената различитих грана прехранбене индустрије, као и применом оптимизоване подлоге са глукозом. Одличним поклапањем ($R^2 > 0,9$) експериментално добијених и моделом предвиђених вредности кинетичких параметара потврђено је да се примењени модели могу користити за адекватно описивање кинетике биопроееса производње ксантана применом ефлуената различитих грана прехранбене индустрије као основе култивационог медијума.

- На основу експериментално добијених и података из литературе развијен је модел постројења за биотехнолошку производњу ксантана применом отпадних ефлуената различитих грана прехранбене индустрије. Симулација модела биопроееса производње ксантана на медијумима који као основу садрже отпадне воде из различитих грана прехранбене индустрије је изведена применом кинетичких параметра који описују настајање биомасе, биосинтезу ксантана и потрошњу извора угљеника, а који су добијени као резултат истраживања из оквира ове докторске дисертације. Резултати показују да се вредности из симулационог модела добро слажу са експерименталним вредностима почетних и крајњих садржаја биомасе, производа и извора угљеника као и са вредностима добијеним кинетичким моделовањем. Симулационим моделом је предвиђено да се, под примењеним условима, добија 449,57-571,23 kg/šarži ксантана, чистоће 93,13-93,43%.
- Као резултат симулације изведена је основна економска анализа модела биопроееса производње ксантана на оптимизованој полусинтеичкој подлози са глукозом, као и на култивационим медијумима који као основу садрже отпадне воде из различитих грана прехранбене индустрије и индустрије пића. За економску процену у обзир су узети радни капитал и оперативни трошкови чије вредности износе 16000-20000\$ и 183000-224000\$/god, редоследом. Продуктивност процесa производње ксантана је 35066,72-44556,06 kg/god, док је јединична цена производње креће у интервалу 4,10-5,21 \$/kg.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Ahmad AL, Wong SS, Teng TT, Zuhairi A (2007): Optimization of coagulation-flocculation process for pulp and paper mill effluent by response surface methodological analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 145, 162-168.
- Ahmed J, Ramaswamy HS (2004): Effect of high-hydrostatic pressure and concentration on rheological characteristics of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 18, 367–373.
- Alkaya E, Demirer GN (2011): Anaerobic mesophilic co-digestion of sugar-beet processing wastewater and beet-pulp in batch reactors. *Renewable Energy*, 36, 971-975.
- Altıok D, Tokatlı F, Harsa S (2006): Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1190–1197.
- Alturkmani A (2013): Industrial Wastewater. <http://www.4enveng.com> (приступљено: 10.3.2016)
- Amanullah A, Satti S, Nienow AW (1998): Enhancing xanthan fermentations by different modes of glucose feeding. *Biotechnology Progress*, 14, 265–269.
- Ammar A (2014): Food Processing Wastes: Characteristics, Treatments and Utilization. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 7(1), 71-84.
- Anderson J (2003): The environmental benefits of water recycling and reuse. *Water Science and Technology: Water Supply*, 3(4), 1–10.
- Aslan S, Alyüz B, Bozkurt Z, Bakaoğlu M (2009): Characterization and Biological Treatability of Edible Oil Wastewaters. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(4), 533-538.
- Azbar N, Yonar T (2004): Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater (VORW). *Process Biochemistry*, 39, 869–875.
- Bai HZ, Zhang XH, Qi YH, Peng WX, Li JB (2004): Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource technology*, 95, 49-52.
- Bajić B, Dodić J, Rončević Z, Grahovac J, Dodić S, Vučurović D, Tadijan I (2014): Biosynthesis of xanthan gum on wastewater from confectionary industry. *Review of Faculty of Engineering, Analecta Technica Szegedinensia*, 8(2), 13-17.
- Bajić B, Dodić S, Vučurović D, Dodić J, Grahovac J (2015b): Waste-to-energy status in Serbia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 1437-1444.
- Bajić B, Rončević Z, Dodić S, Grahovac J, Dodić J (2015a) Beverage industry wastewaters treatment using biotechnological process. In: 17th IWA International Conference on Diffuse Pollution and Eutrophication, Berlin, 1-6.
- Bajić B, Rončević Z, Dodić S, Grahovac J, Dodić J (2015c): Glycerol as a carbon source for xanthan production by *Xanthomonas campestris* isolates. *Acta Periodica Technologica*, 46 (1), 197-206.
- Bajić B, Rončević Z, Puškaš V, Miljić U, Dodić S, Grahovac J, Dodić J : (2015d): White wine production effluents used for biotechnological production of xanthan. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 19(1), 52-55.
- Bajić B, Vučurović D, Dodić S, Grahovac J, Dodić J (2016b): Economic analysis of a modelled process for xanthan production from confectionery industry wastewaters. *Proceedings of the 11th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, SDEWES2016.0304*, 1-8.
- Bajić B, Vučurović D, Dodić S, Grahovac J, Dodić J (2016c): Developing a process and cost model for xanthan biosynthesis from bioethanol production waste effluents. *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology*, 18 ((5), Part XIV), 1796.
- Bajić B, Vučurović D, Dodić S, Rončević Z, Grahovac J, Dodić J (2016a): The biotechnological production of xanthan on vegetable oil industry wastewaters (Part I): Modelling and optimization, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*.
- Барас Ј, Вељовић В, Попов С, Повреновић Д, Лазић М, Златковић Б (2009): Основи биопроцесног инжењерства, Лесковац.
- Barboza M, Leite J, Pozzi E, Pelizer L, Zaiat M (2009): Production of xanthan gum using different organic acids in culture medium; *New Biotechnology*, 25, S225.
- Becker A, Katzen F, Pühler A, Ielpi L. (1998): Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 145-152.

- Bilanovic D, Chang H, Isobaev P, Welle P (2011): Lactic acid and xanthan fermentations on an alternative potato residues media-carbon source costs. *Biomass Bioenergy*, 35, 2683-9.
- Biswanath B, Basak B, Bhattacharya P, Dey A (2012): Kinetic Studies of Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1758-1766.
- Borges CD, Moreira AS, Vendruscolo CT, Ayub MAZ (2008): Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. *Revista Argentina de Microbiologia*, 40, 81-85.
- Born K, Langendorff V, Boulenguer P (2005): Xanthan In: Polysaccharides and polyamides in the food industry, John Wiley and Sons Ltd, 259-291.
- Бранковић Илић И, Лазић М, Вељовић В, Мојовић Љ (2007): Џибра-секундарни производ алкохолне ферментације. Зборник радова Технолошког факултета, Лесковац, 16, 100-107.
- Brito AG, Peixoto J, Oliveira JM, Oliveira JA, Costa C, Nogueira R, Rodrigues A (2007): Brewery and winery wastewater treatment: Some focal points of design and operation. In: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry (editors Oreopoulou V, Russ W). ISEKI-Food, Springer Science, New York, 109-133.
- Buyukgungor H, Gurel L (2009): The role of biotechnology on the treatment of wastes. *African Journal of Biotechnology*, 8 (25), 7253-7262.
- Casas JA, Santos VE, García-Ochoa F (2000): Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 282-291.
- Chang M, Zhou SG, Lu N, Ni JR (2008): Starch processing wastewater as a new medium for production of *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 441-447.
- Cheetham NWH, Norma NMN (1989): The effect of pyruvate on viscosity properties of xanthan. *Carbohydrate Polymers*, 10, 55-60.
- Cheng R, Lin L, Zhang Y (2011): Hydrogen peroxide (H₂O₂) supply significantly improves xanthan gum production mediated by *Xanthomonas campestris* in vitro. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.
- Cristian O (2010): Characteristics of the untreated wastewater produced by food industry. *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula: Protecţia Mediului*, 15, 709-14.
- Далмација Б, Бечелић-Томин М, Крчмар Д, Лазић Н (2011): Воде. У: Животна средина у Аутономној покрајини Војводини: стање-изазови-перспективе, (ур: Пузовић С, Радовановић-Јовин Х). Покрајински секретаријат за урбанизам, градитељство и заштиту животне средине, Нови Сад, 94-134.
- Далмација Б, Бечелић-Томин М, Малетић С (2014): Контрола пречишћавања отпадних вода. Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду.
- D' Annibale A, Giovannozzi S, Sermanni G, Federici F, Petruccioli M (2006): Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, 97, 1828-1833.
- De Vuyst L, Vermiere A, Van Loo J, Vandamme EJ (1987): Nutritional, physiological and process-technological improvements of xanthan gum fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 1881-1900.
- Додић Ј (2000): Прилог проучавању биосинтезе ксантана. Магистарска теза, Технолошки факултет Нови Сад. Универзитет у Новом Саду.
- Додић Ј, Бајић Б, Граховац Ј (2014): Течни ефлуенти индустрије-потенцијалне сировине за биотехнолошку производњу. Зборник радова КОР 2014, АндРЕВЉЕ, 78-85.
- Додић Ј, Граховац Ј (2013): Индустријска микробиологија-практикум, Технолошки факултет Нови Сад. Универзитет у Новом Саду.
- Dodić J, Grahovac J, Jokić A, Bajić B, Dodić S, Vučurović D, Popov S (2012a): Biological treatment of different food industrial wastewater by *Xanthomonas campestris*. *Analecta Technica Szegedinsensia*, 41-46.
- Dodić J, Vučurović D, Dodić S, Grahovac J, Popov S, Nedeljković N (2012b): Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy*, 99, 192-197.
- Dodić S, Popov S, Dodić J, Grahovac J, Zavargo Z (2010a): Biomass energy in Vojvodina: Market conditions, environment and food security, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 862-867.
- Dodić S, Zekić V, Rodić V, Tica N, Dodić J, Popov S (2010b): Situation and perspectives of waste biomass application as energy source in Serbia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 14, No 9, pp. 3171-3177, 2010.
- Dodić S, Zekić V, Rodić V, Tica N, Dodić J, Popov S (2011): Analysis of energetic exploitation of straw in Vojvodina, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 1147-1151.
- Еко-билтен 2013 (2014), Република Србија – Републички завод за статистику, Београд.
- Esfahanian M, Nikzad M, Najafpour G, Ghoreyshi AA (2013): Modeling and optimization of ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*: response surface methodology and artificial neural network. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 19(2), 241-252

- Faria S, Vieira PA, Resende MM, El Ribeiro EJ, Cardoso VL (2010): Application of a model using the phenomenological approach for prediction of growth and xanthan gum production with sugar cane broth in a batch process. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 498–506.
- Faria S, Vieira PA, Resende MM, Franca FP, Cardoso VL (2009): A Comparison Between Shaker and Bioreactor Performance Based on the Kinetic Parameters of Xanthan Gum Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156, 475–488.
- Faria S, de Oliveira Petkowicz CL, de Moraes SAL, Terrones MGH, de Resende MM, de Franca FP, Cardoso VL (2011): Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 469–476.
- Flickinger MC, Drew SW (1999): *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation*. John Wiley and Sons Inc, New York.
- Fountoulakis SM, Drakopoulou S, Terzakis S, Georgaki E, Manios T (2008): Potential for methane production from typical Mediterranean agro-industrial by-products. *Biomass and bioenergy*, 32, 155–161.
- Гаћеша С (1980): *Основе технологије воде и отпадних вода*, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.
- Gales MEJ, Julian EC, Kroner RC (1966): Method for quantitative determination of total phosphorus in water. *Journal -American Water Works Association*, 58, 1363–1368.
- Galindo E, Salcedo G (1996): Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 145–149.
- Ganduri VSRK, Mangamuri U, Vijayalakshmi M, Poda S (2016): Model-based kinetic parameters estimation in batch Pullulan fermentation using Jaggery as substrate. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), 217–224.
- Garcia-Ochoa F, Gomez Castro E, Santos VE (2000b): Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 680–690.
- Garcia-Ochoa F, Santos VE, Alcon A (1995): Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 206–217.
- Garcia-Ochoa F, Santos VE, Alcon A (1996): Simulation of xanthan gum production by a chemically structured kinetic model. *Mathematics and Computers in Simulation*, 42, 187±95.
- Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E (2000a): Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18, 549–579.
- Garcia-Ochoa F, Santos VE, Fritsch AP (1992): Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 991–997.
- Ghashghaei T, Soudi MR, Hoseinkhani S (2016): Optimization of Xanthan Gum Production from Grape Juice Concentrate Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Applied Food Biotechnology*, 3(1), 15–23.
- Gilani SL, Heydarzadeh HD, Mokhtarian N, Alemian A, Kolaei M (2011a): Effect of Preparation Conditions on Xanthan Gum Production and Rheological Behavior using Cheese Whey by *Xanthomonas campestris*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(10), 855–859.
- Gilani SL, Najafpour GD, Heydarzadeh HD, Zare H (2011b): Kinetic models for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* from molasses. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 17, 179–187.
- Glazer A, Nikaido H (2007): *Microbial biotechnology*, Cambridge University Press, New York.
- Граховац Ј (2011): *Оптимизација добијања етанола ферментацијом међупроизвода технологије прераде шећерне репе*. Докторска дисертација. Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.
- Grahovac J, Jokić A, Dodić J, Vučurović D, Dodić S (2016): Modelling and prediction of bioethanol production from intermediates and byproduct of sugar beet processing using neural networks, *Renewable Energy*, 85, 953–958.
- Грујић Р, Франц А (2013): *Одрживе технологије у прехранбеној индустрији* (ур. Грујић Р, Јашић М). Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.
- Guerra NP, Fajardo P, Fucinos C, Amado IR, Alonso E, Torrado A, Pastrana L (2010): Modelling the Biphasic Growth and Product Formation by *Enterococcus faecium* CECT 410 in Realized Fed-Batch Fermentations in Whey. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 290286, 16 p.
- Hassler RA, Doherty DH (1990): Genetic engineering of polysaccharide structure: Production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress*, 6, 182–187.
- Heinze E, Biber A, Cooney C (2006): *Development of Sustainable Bioprocesses*, John Wiley and Sons Ltd.
- Heponiemi A, Lassi U (2012): Advanced Oxidation Processes in Food Industry Wastewater Treatment—A Review, In: *Food Industrial Processes-Methods and Equipment* (ed. Valdez, B), InTech.
- Herlich K, editor (1990): *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Arlington, VAA: AOAC. 758–759.
- Isla AM, Comelli NR, Seluy GL (2013): Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 136, 140–147.

- Jana AK, Ghosh P (1997): Stimulation of xanthan production by *Xanthomonas campestris* using citric acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 261-264.
- Janas P, Gustaw W, Mleko S, Pielecki J (2003): Effect of detergents on xanthan production during batch and continuous cultivation of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Technologia Alimentaria*, 2(1), 125-133.
- Jeeva S, Mohan TS, Palavesam A, Packia Lekshmi NCJ, Brindha JR (2011): Production and optimization study of a Novel Extracellular Polysaccharide by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 175-182.
- Jhansi SC, Mishra SK (2013): Wastewater Treatment and Reuse: Sustainability Options. *Consilience: The Journal of Sustainable Development*, 10(1), 1-15.
- Jin B, van Leeuwen J, Patel B (1999): Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 34, 335-340.
- Kalogiannis S, Iakovidou G, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA, Skaracis GN (2003): Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*, 39, 249-56.
- Kamal F, Mehrgan H, Assadi MM, Mortazavi SA (2003): Mutagenesis of *Xanthomonas campestris* and selection of strains with enhanced xanthan production. *Iranian Biomedical Journal*, 7(3), 91-98.
- Kerdsup P, Tantratian S, Sanguandeekul R, Imjongjirak C (2011): Xanthan Production by Mutant Strain of *Xanthomonas campestris* TISTR 840 in Raw Cassava Starch Medium, *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1459-1462.
- Khosravi DK, Reyhani SF, Nasernejad B (2011): Bench scale production of xanthan from date extract by *Xanthomonas campestris* in submerged fermentation using central composite design. *African Journal of Biotechnology*, 10, 13520-13527.
- Клашња М, Шћибан М (2000): Основи процеса анаеробног пречишћавања отпадних вода прехранбене индустрије и индустрије пића, *Acta Periodica Technologica*, 31, 3-22.
- Kuppusamy M, Thangavelu V, Kumar A, Chockalingam (2015): Kinetics and modeling of tannase production using *aspergillus foetidus* in batch fermentation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2).
- Kurbanoglu EB, Kurbanoglu NI (2007): Ram horn hydrolysate as enhancer of xanthan production in batch culture of *Xanthomonas campestris* EBK-4 isolate. *Process Biochemistry*, 42, 1146-1149.
- Lachke A (2004): Xanthan—A Versatile Gum. *Resonance*, 24-33.
- Laubscher ACJ, Wentzel MC, Le Roux JMW, Ekama GA (2001): Treatment of grain distillation wastewater in an up flow anaerobic sludge bed (UASB) system. *Water SA*, 27, 433-444.
- Leela J.K, Sharma G (2000): Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 23, 687-689.
- Leite JAC, Pozzi E, Pelizer LH, Zaiat M, Barboza M (2013): Use of volatile fatty acids salts in the production of xanthan gum. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(2).
- Letisse F, Lindley ND, Roux G (2003): Development of a phenomenological modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress*, 19, 822-827.
- Li P, Li T, Zeng Y, Li X, Jiang X, Wang Y, Xie T, Zhang Y (2016): Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydrate Polymers*, 151, 684-691.
- Liakopoulou-Kyriakides M, Tzanakakis ES, Kiparissidis C, Ekaterianiadou LV, Kyriakidis DA (1997): Kinetics of Xanthan Gum Production from Whey by Constructed Strains of *Xanthomonas campestris* in Batch Fermentations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 20, 354-360.
- Lim HC, Shin HS (2013): *Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors*. Cambridge University Press. New York, USA.
- Liu XS (2007): *Food and Agricultural Wastewater Utilization and Treatment*, Oxford, UK.
- Lo YM, Yang ST, Min DB (1997): Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 689-694.
- Lopez MJ, Ramos-Cormenzana A (1996): Xanthan Production from Olive-Mill Wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 263-270.
- Luong JHT, Mulchandani A, Leduy A (1988): Kinetics of biopolymers synthesis: a revisit. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(6), 326-333.
- Marbrouk M, El Ahwany A, Beliah M, Sabry S (2013): Xanthan production by a novel mutant strain of *Xanthomonas campestris*: Application of statistical design for optimization of process parameters. *Life Science Journal*, 10(1).
- Miller GL (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mirik M, Demirci AS, Gumus T, Arici M (2011): Xanthan Gum Production under Different Operational Conditions by *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* Isolated from Pepper Plant. *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1243-1247.

- Mohana S, Acharya B, Madamwar D (2009): Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 12–25.
- Moosavi- Nasab M, Pashangeh S, Rafsanjani M (2010): Effect of Fermentation Time on Xanthan Gum Production from Sugar Beet Molasses. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 68.
- Moosavi- Nasab M, Shekaripour F, Alipoor M (2008): Use of date sirup as Agricultural Waste for Xanthan Production by *Xanthomonas campestris*. *Iran Agricultural Research*, 27(1-2).
- Moraine RA, Rogovin P (1971): Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*, 13, 381–391.
- Moreno J, Lopez MJ, Vargas-Garcia C, Varquez R (1998): Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 242-246.
- Moshaf S, Hamidi-Esfahani Z, Azizi MH (2011): Optimization of conditions for xanthan gum production from waste date in submerged fermentation. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5, 471-474.
- Mosse KPM, Patti AF, Christen EW, Cavagnaro TR (2011): Review: Winery wastewater quality and treatment options in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 111-122.
- Niknezhad SV, Asadollahi MA, Zamani A, Biria D (2015): Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 24, 453-460.
- Palaniraj A, Jayaraman V (2011): Production, recovery and application of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 106, 1-12.
- Pandey RA, Sanyal PB, Chattopadhyay N, Kaul SN (2003): Treatment and reuse of wastes of a vegetable oil Refinery. *Resources, Conservation and Recycling*, 37, 101-117.
- Pinches A, Pallent LJ (1986): Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1484–1496.
- Пејин Д (2003): Индустриска микробиологија, Технолошки факултет Нови Сад. Универзитет у Новом Саду.
- Попов С (2000): Основи биопроцесног инжењерства Теорија и пракса, Технолошки факултет Нови Сад. Универзитет у Новом Саду.
- Pons A, Dussa, CG, Gros JB (1990): Xanthan batch fermentation: compared performances of a bubble column and a stirred tank fermentor. *Bioprocess Engineering*, 5, 107–114.
- Prachanurak P, Chiemchaisri C, Chiemchaisri W, Yamamoto K (2014): Biomass production from fermented starch wastewater in photo-bioreactor with internal overflow recirculation. *Bioresource Technology*, 165, 129-136.
- Psomas SK, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA (2007): Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 273–280.
- Qasim W, Mane AV (2013): Characterization and treatment of selected food industrial effluents by coagulation and adsorption techniques. *Water Resources and Industry*, 4, 1–12.
- Rafigha SM, Yazdia AV, Vossoughib M, Safekordia AA, Ardjmand M (2014): Optimization of culture medium and modeling of curd production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 463–473.
- Rajendran A, Thirugnanam M, Thangavelu V (2007): Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*, *Indian Journal of Biotechnology*, 6(4).
- Rodriguez Caballero A, Ramond JB, Welz PJ, Cowan DA, Odlare M, Burton SG (2012): Treatment of high ethanol concentration wastewater by constructed wetlands: enhanced COD removal and bacterial community dynamics. *Journal of Environmental Management*, 109, 54-60.
- Rončević Z, Bajić B, Grahovac J, Dodić S, Miljić U, Puškaš V, Dodić J (2015): Wastewaters from rose wine production as substrate for xanthan production. *International Journal of Environmental Engineering*, 2(2), 150-153.
- Rosalam S, England R (2006): Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 197-207.
- Rosenwinkel KH, Austermann-Haun U, Meyer H (2005): Industrial Wastewater Sources and Treatment Strategies. In: *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications* (ed. Jördening HJ, Winter J), Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.
- Salah RB, Chaari K, Besbes S, Ktari N, Blecker C, Deroanne C, Attia H (2010): Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121, 627–633.
- Sandford PA, Baird J, (1983): Production, properties and applications of xanthan gum In: *The polysaccharides* (ed. Aspinall GO), Academia Press, Prague.
- Schweickart RW, Quinlan AV (1989): Kinetics of xanthan production when NH₄ limits biomass synthesis and glucose limits polysaccharide synthesis. *Journal Biomechanical Engineering*, 111, 166–171.

- Serrano-Carreón L, Corona RM, Sanchez A, Galindo E (1998): Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. *Process Biochemistry*, 33(2), 133–146.
- Shanklin T, Roper K, Yegneswaran PK, Marten MR (2011): Selection of bioprocess simulation software for industrial applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 483-9.
- Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC (2006): Xanthan gum – A Boon to Food Industry. *Food Promotion Chronicle*, 1(5), 27-30.
- Shehni SA, Soudi MR, Hosseinkhani S, Behzadipour N (2011): Improvement of xanthan gum production in batch culture using stepwise acetic stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(83), 19425-19428.
- Silva MF, Fornari RCG, Mazutti MA, Oliveira D, Padilha FF, Cichoski AJ, Cansian RL, Luccio MD, Treichel H (2009): Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90, 119-123.
- Smith IH, Symes KC, Lawson CJ, Morris ER (1981): Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3, 129–134.
- Smith JE (2004): *Biotechnology*, 4th edition. Cambridge University Press.
- Sokolowski JA, Banks CM (2009): *Principles of Modeling and Simulation A Multidisciplinary Approach*, John Wiley and Sons Ltd.
- Souw P, Demain AL (1979): Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Applied And Environmental Microbiology*, 37, 1186-1192.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998): APHA, AWWA, WEF, 20th edition, Washington DC.
- Статистички годишњак Републике Србије (2014) Република Србија – Републички завод за статистику, Београд.
- Стефановић Д, Војновић-Милорадов М, Лемић Ј, Курајица М, Ковачевић Д (2008): Мерење физичко-хемијских карактеристика отпадних вода млекаре. *Ветеринарски гласник*, 62(5-6), 395-402.
- Шушић С, Петров С, Кукић Г, Синобад В, Перуновић П, Коронсовац Б, Башић Ђ (1994): *Основи технологије шећера, Индустија шећера СР Југославија „Југошећер“*, Београд.
- Sutherland IW (1990): *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*, University of Edinburgh.
- Sworn G (2011): Xanthan Gum- Functionality and Application. In: *Practical Food Rheology- An Interpretative Approach* (ed. Norton IT, Spyropoulos F, Cox P), University of Birmingham.
- Tait MI, Sutherland IW, Sturman C (1986): Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. *Journal of General Microbiology*, 132, 1483–1492.
- Tamilarasan K, Kumar MD (2011): Kinetic modeling and analysis of kinetic parameters for solvent-tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. *Research Journal Of Microbiology*.
- Уредба о граничним вредностима емисије загађујућих материја у воде и роковима за њихово достизање, „Службени гласник РС“ бр. 67/11 и 48/12.
- Villena GK, Gutiérrez-Correa M (2012): Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(5), 805-814.
- Vinayagam R, Vytla RM, Chandrasekaran M (2015): Development of a Simple Kinetic Model and Parameter Estimation for Biomass and Nattokinase Production by *Bacillus subtilis* 1A752 . *Austin Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 2(1).
- Vlyssides AG, Barampouti EM, Mai S (2005): Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science and Technology*, 51(1), 53–60.
- Vučurović D, Dodić S, Popov S, Dodić J, Grahovac J (2012): Process model and economic analysis of ethanol production from sugar beet raw juice as part of the cleaner production process, *Bioresource Technology*, Vol. 104, pp. 367-372, 2012.
- Wang L, Hung Y-T, Lo H, Yapikakis C (2006): *Waste Treatment in the Food Processing Industry*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Wang X, Xu P, Yuan Y, Liu C, Zhang D, Yang Z, Yang C, Ma C (2006): Modeling for Gellan Gum Production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a Simplified Medium. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(5), 3367–3374.
- Weiss RM, Ollis DF (1980): Extracellular microbial polysaccharides. Substrate, biomass, and product kinetics equation for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 859–873.
- Whitman WB (2009) *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Volume 3: The Firmicutes, 2nd edition. Springer, New York.
- Wilkie A, Riedesel K, Owens J (2000): Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19, 63-102.
- Вучуровић Д (2015): Модел биопроцеса производње етанола из међу- и нуспроизвода прераде шећерне репе. Докторска дисертација, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.
- Вучуровић Д, Додић С, Попов С (2012): Пројектовање биопроцеса, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.

- Yetis M, Gündüz U, Eroglu I, Yücel M, Türker L (2000): Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 25, 1035-1041.
- Yoo SD, Harcum SW (1999): Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, 70, 105-109.
- Zhang Z, Chen H (2010): Fermentation Performance and Structure Characteristics of Xanthan Produced by *Xanthomonas campestris* with a Glucose/Xylose Mixture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160,1653–1663.
- Zhang ZY, Jin B, Bai ZH, Wang XY (2008): Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 99, 3871-3876.
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury F (1999): *Wine Analysis and Production*. Kluwer Academic, New York.
- Закон о водама, „Службени гласник РС“ бр. 30/10.
- Закон о заштити животне средине. „Службени гласник РС“ бр. 135/04 и 36/09.
- <http://www.pkv.rs> (приступљено: 7.5.2014)

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број ИБР	
Тип документације: ТД	монографска документација
Тип записа: ТЗ	текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Бојана Ж. Бајић
Ментор: МН	Др Јелена Додић, ванредни професор, Технолошки факултет Нови Сад
Наслов рада: НР	Модел биопроцеса производње ксантана на ефлуентима прехранбене индустрије
Језик публикације: ЈП	српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	српски/енглески
Земља публиковања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Војводина
Година: ГО	2016
Издавач: ИЗ	ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Булевар цара Лазара 1
Физички опис рада: ФО	број поглавља 7; страна 154; табела 53; слика 66; једначина 19; литературних навода 165
Научна област: НО	Технолошко инжењерство
Научна дисциплина: НД	Биотехнологија
Предметна одредница, кључне речи: ПО УДК	биотехнолошка производња, ефлуенти прехранбене индустрије, ксантан, моделовање, симулација 577.114:628.387:661.7(043.3)
Чува се у: ЧУ	Библиотека Технолошког факултета Нови Сад, 21000 Нови Сад, Булевар цара Лазара 1
Важна напомена: ВН	нема

Извод:**ИЗ**

Све обимнија индустријализација која је одговор на захтеве потрошачког друштва, велики је експлоататор ресурса и генератор, поред жељеног производа и великих количина отпадних токова. У највећем број случајева индустријски ефлуенти бивају испуштени у природне реципијенте јер већ њихова примарна обрада изискује додатна улагања. Развојем технике и технологије омогућена је примена биопроцеса у ову сврху, али само искоришћење отпадних вода као сировине за биотехнолошку производњу обећава симултану заштиту животне средине и економску добит, односно представља решење проблема које је одрживо.

У оквиру истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом доказана је могућности примене отпадних вода прехранбене индустрије као основе култивационог медијума у биотехнолошкој производњи биополимера ксантана. Полазни корак за индустријализацију предложеног поступка је развој симулационог модела који у највећој мери треба да опише реалну ситуацију у материјалном, енергетском, еколошком и економском смислу. Реализација оваквог циља захтева познавање узрочно-последичне везе између метаболичке активности примењеног биокатализатора и процесних услова међу којима је веома значајан састав култивационог медијума.

У ту сврху извршена је карактеризација 18 отпадних вода које припадају различитим гранама преграмбене индустрије и потврђена могућност њихове примене као основе култивационог медијума за биотехнолошку производњу ксантана. Експериментално је потврђена могућност производње ксантана на овим ефлуентима применом производног микроорганизма *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, извођењем биопроцеса у биореактору стандардних геометријских односа, запремине 2 l. Оптимизација састава култивационог медијума са отпадним водама одабраних грана прехранбене индустрије, у погледу најзначајнијих нутријената и са циљем добијања што већег садржаја жељеног производа, изведена је применом методе жељене функције. У наставку истраживања, дефинисана је кинетика биосинтезе ксантана у биореактору запремине 7 l, а добијени кинетички модели за умножавање биомасе (логистичка једначина), настајање производа (Luedeking-Piret-ова једначина) и потрошњу извора угљеника (модификована Luedeking-Piret-ова једначина)) су искоришћени за развој симулационог модела биопроцеса производње ксантана применом ефлуената прехранбене индустрије.

Генерисаним симулационим моделом производње ксантана применом отпадних ефлуената различитих грана прехранбене индустрије су предвиђени првенствено процесни, а потом и економски показатељи овог биотехнолошког процеса. Са технолошког аспекта, резултати ових истраживања представљају поуздан извор информација за дефинисање идејног решења предложеног биопроцеса који је основа за израду главног технолошког пројекта.

Датум прихватања теме од стране Сената: 12.07.2016. године

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник: Др Драгиша Савић, редовни професор, Технолошки факултет у Лесковцу

Члан: Др Јелена Додић, ванредни професор, Технолошки факултет Нови Сад

Члан: Др Дамјан Вучуровић, доцент, Технолошки факултет Нови Сад

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: monographic publication
DT

Type of record: textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Bojana Ž. Bajić
AU

Mentor: Jelena Dodić, associate professor, Faculty of Technology
Novi Sad
MN

Title: Bioprocess model of xanthan production on food
processing industry wastewaters
TI

Language of text: Serbian (cyrilic)
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2016
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: Chapters 7; pages 154; tables 53; figures 66;
equations 19; refernces 165
PD

Scientific field Technological engineering
SF

Scientific discipline Biotechnology
SD

Subject, Key words biotechnological production, food processing industry
waste effluents, modeling, simulation, xanthan,
SKW
577.114:628.387:661.7(043.3)
UC

Holding data: Library of Faculty of Technology Novi Sad,
21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia
HD

Note: none
N

Abstract:**AB**

Increasing industrialization as a response to the demands of the consumer society greatly exploits resources and generates large amounts of waste effluents in addition to the desired product. In most cases industrial effluents are discharged into the natural environment because even their primary processing requires additional investments. The development of biotechnology has enabled bioprocesses to be used for this purpose, and using wastewaters as raw materials for biotechnological production simultaneously provides preservation of the environment and economic benefits which is a sustainable solution to the problem.

Within the research covered in this doctoral thesis it was proven it is possible to use food and beverage industry wastewaters as a basis for the cultivation media in the biotechnological production of xanthan. The starting step in industrializing the suggested process is to develop a simulation model which best represents the realistic situation and its material, energy, environmental and economic aspects. Realizing this goal requires the author/researcher to be familiar with the causal link between the metabolic activity of the used biocatalyst and process conditions among which the composition of the cultivation media is very significant.

In order to accomplish this goal, 18 wastewaters from different branches of the food and beverage industry were characterized and were confirmed to have the capability to be used as a cultivation media for the biotechnological production of xanthan. Experiments confirmed the possibility of producing xanthan on these effluents using the production microorganism *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 in a 2 liter bioreactor of standard geometric characteristics. Composition of the cultivation media based on the wastewaters of the selected food and beverage industry branches was optimized using the desirability function method, focusing on the most significant nutrients and with the goal of obtaining the maximum amount of the desired product. In further research, the kinetics of xanthan biosynthesis in a 7 liter bioreactor were defined, and the obtained kinetic models for biomass multiplication (logistic equation), product formation (*Luedeking-Piret* equation) and carbon source consumption (modified *Luedeking-Piret* equation) were used to develop a simulation model of the xanthan production bioprocess using food and beverage processing industry effluents.

The generated simulation model of xanthan production using waste effluents of different branches of the food and beverage industry predicts primarily the process but also the economic indicators of this biotechnological process. From a technological perspective, the results of this research represent a reliable source of information for defining a general design of the suggested bioprocess as a basis for the creation of a major biotechnological project.

Accepted on Senate on:12th July 2016**AS****Defended:****DE****Thesis Defend Board:****DB**

President: PhD Dragiša Savić, professor, Faculty of Technology in Leskovac

Member: PhD Jelena Dodić, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad

Member: PhD Damjan Vučurović, assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad