



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

**Зорана Рончевић, мастер инжењер**

**ОПТИМИЗАЦИЈА ПРОИЗВОДЊЕ КСАНТАНА  
У ЛАБОРАТОРИЈСКОМ БИОРЕАКТОРУ НА  
ОТПАДНИМ ВОДАМА ВИНАРИЈА**

докторска дисертација

Нови Сад • 2016

# САДРЖАЈ

---

СПИСАК ОЗНАКА, СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА .....	iii
СПИСАК ТАБЕЛА .....	v
СПИСАК СЛИКА .....	viii
1. УВОД .....	1
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	2
3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....	3
3.1. Потреба за водом у биотехнолошкој производњи.....	4
3.2. Отпадне воде винарија као сировине за биотехнолошку производњу .....	6
3.2.1. Карактеризација отпадних вода винарија.....	7
3.2.1.1. Порекло отпадних вода винарија.....	7
3.2.1.2. Количина отпадних вода винарија.....	8
3.2.1.3. Састав отпадних вода винарија.....	10
3.2.2. Управљање отпадним водама винарија у Републици Србији .....	13
3.2.3. Примена отпадних вода винарија у биотехнолошкој производњи .....	14
3.3. Биотехнолошка производња ксантана .....	15
3.3.1. Структура молекула и функционалне карактеристике раствора ксантана.....	16
3.3.2. Бактерије рода <i>Xanthomonas</i> .....	17
3.3.3. Хранљиве подлоге и култивациони медијуми за производњу ксантана .....	18
3.3.4. Процесни услови.....	20
3.3.4.1. Вредност рН.....	20
3.3.4.2. Садржај раствореног кисеоника.....	21
Аерација.....	22
Мешање.....	22
3.3.4.3. Температура.....	23
3.3.4.4. Стерилност .....	24
3.3.5. Биореактори за производњу ксантана.....	24
3.3.6. Производни поступак .....	25
3.3.7. Стратегије за развој производње ксантана у увећаним размерама .....	27
3.4. Моделовање и оптимизација биотехнолошких процеса.....	28
3.4.1. Поступак одзивне површине .....	29
3.4.1.1. Одређивање независних промењивих и њихових нивоа .....	29
3.4.1.2. Одабир експерименталног дизајна.....	30
3.4.1.3. Дефинисање математичких модела.....	30
3.4.1.4. Предности и недостаци примене поступка одзивне површине.....	30
3.4.2. Метода жељене функције.....	31
3.4.3. Моделовање и оптимизација биотехнолошке производње ксантана .....	31

<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>32</b>
4.1. Производни микроорганизам .....	33
4.2. Састав хранљивих подлога и култивационих медијума .....	33
4.3. Припрема инокулума.....	34
4.4. Услови биосинтезе.....	34
4.5. Издвајање производа .....	35
4.6. Аналитички поступци .....	35
4.6.1. Анализа отпадних вода винарија.....	35
4.6.2. Анализа култивационе течности.....	36
4.6.3. Анализа биосинтетисаног ксантана.....	38
4.7. Статистичка анализа.....	39
4.8. Математичко моделовање и оптимизација .....	39
<b>5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА</b> .....	<b>41</b>
5.1. Скрининг могућности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија.....	42
5.2. Састав отпадних вода винарија.....	44
5.3. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија .....	50
5.3.1. Испитивање тока биосинтезе ксантана на појединачним отпадним водама винарија.....	51
5.3.1.1. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих фаза производње белог вина .....	52
5.3.1.2. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих фаза производње розе вина .....	61
5.3.1.3. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих фаза производње црвеног вина .....	69
5.3.2. Испитивање тока биосинтезе ксантана на намешаним отпадним водама винарија.....	76
5.4. Формулација састава медијума за биосинтезу ксантана чија су основа отпадне воде винарија.....	83
5.4.1. Формулација састава медијума за биосинтезу ксантана чија су основа отпадне воде из производње белог вина .....	84
5.4.2. Формулација састава медијума за биосинтезу ксантана чија су основа отпадне воде из производње розе вина .....	88
5.4.3. Поређење успешности биосинтезе ксантана на медијумима оптималне формулације .....	90
5.5. Моделовање и оптимизација биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија.....	97
5.5.1. Извођење статистички дизајнираних експеримената .....	98
5.5.2. Дефинисање математичких модела.....	104
5.5.2.1. Провера адекватности математичких модела .....	104
5.5.2.2. Математички модел за садржај биомасе.....	105
5.5.2.3. Математички модел за садржај раствореног кисеоника.....	108
5.5.2.4. Математички модел за садржај шећера .....	111
5.5.2.5. Математички модел за садржај укупног и асимилабилног азота.....	112
5.5.2.6. Математички модел за садржај укупног фосфора.....	113
5.5.2.7. Математички модел за вискозитет култивационог медијума .....	114
5.5.2.8. Математички модел за садржај ксантана .....	115
5.5.2.9. Математички модел за молекулску масу ксантана.....	118
5.5.2.10. Математички модел за вискозитет раствора ксантана .....	120
5.5.3. Оптимизација вредности процесних параметара.....	123
5.5.4. Валидација оптимизационих резултата .....	125
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	<b>128</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>131</b>
<b>8. ПРИЛОЗИ</b> .....	<b>108</b>
8.1. Прилог 1 .....	141
8.2. Прилог 2 .....	147

## СПИСАК ОЗНАКА, СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА

---

$[\eta]$	унутрашњи вискозитет, (l/g)
$b_1, b_2, b_3$	линеарни коефицијенти регресионе једначине
$b_{11}, b_{22}, b_{33}$	квадратни коефицијенти регресионе једначине
$b_{12}, b_{13}, b_{23}$	коефицијенти интеракције регресионе једначине
$BOD_5$	биохемијска потрошња кисеоника, (mg/l)
COD	хемијска потрошња кисеоника, (mg/l)
$d$	пречник мешалице у биореактору, (mm)
$D$	брзина смицања, (1/s)
$D_i$	унутрашњи пречник суда биореактора, (mm)
DF	степен слободе
EC	електрична проводљивост, ( $\mu S/cm$ )
Fru	садржај фруктозе, (g/l)
Glu	садржај глукозе, (g/l)
$K$	фактор конзистенције, ( $Pa \cdot s^n$ )
$K_N$	степен конверзије укупног азота, (%)
$K_P$	степен конверзије укупног фосфора, (%)
$K_{P/S}$	степен конверзије извора угљеника у ксантан, (%)
$K_S$	степен конверзије шећера, (%)
$M_w$	средња молекулска маса ксантана, (g/mol)
MS	средња вредност квадрата
$n$	индекс тока, (1)
$N_{as}$	садржај асимилабилног азота, (mg/l)
$N_{uk}$	садржај укупног азота, (mg/l)
$N_{uk0}$	почетни садржај укупног азота, (mg/l)
$O_2$	садржај раствореног кисеоника, (%)
$P$	садржај ксантана, (g/l)
pH	мера активности водоникових јона у раствору, (1)
$P_{uk}$	садржај укупног фосфора, (mg/l)
$P_{uk0}$	почетни садржај укупног фосфора, (mg/l)
$R^2$	коефицијент детерминације
$S$	садржај шећера, (g/l)

$S_0$	почетни садржај шећера, (g/l)
SS	сума квадрата
t	време трајања биопроцеса, (h)
TDS	садржај укупних растворених соли, (mg/l)
TOC	укупан органски угљеник, (mg/l)
TSS	садржај укупних суспендованих честица, (mg/l)
X	садржај биомасе, (cfu/ml)
$X_i$	испитивани фактори укључени у моделовање
$Y_i$	моделовани одзиви
z	константа реолошких мерења, (dyn/cm <sup>2</sup> -Skt)
$\alpha$	отклон казаљке реолошког вискозиметра, (Skt)
$\eta_a$	привидни вискозитет култивационог медијума, (mPa·s)
$\eta_a^P$	привидни вискозитет 1% (w/v) раствора ксантана у 0,1 М натријум-хлориду, (mPa·s)
$\tau$	напон смицања, (Pa)
муљање	фаза у производњи вина где се отпадне воде генеришу током прања муљаче
пресовање	фаза у производњи вина где се отпадне воде генеришу током прања пресе
претакање	фаза у производњи вина где се отпадне воде генеришу током прања танка након првог претакања вина
таложeње	фаза у производњи вина где се отпадне воде генеришу током прања танка након бистрења шире таложeњем уз додаток пектолитичких ензима
ферментација	фаза у производњи вина где се отпадне воде генеришу током прања танка након ферментације шире или кљука
флотација	фаза у производњи вина где се отпадне воде генеришу током прања танка након бистрења шире флотацијом

# СПИСАК ТАБЕЛА

---

Табела 3.1. Утицај фаза у производњи вина на квантитет и квалитет отпадних вода.....	9
Табела 3.2. Карактеризација отпадних вода винарија.....	12
Табела 3.3. Граничне вредности емисије на месту испуштања у површинске воде.....	14
Табела 4.1. Бокс-Бенкенов експериментални план и вариране вредности испитиваних араметара.....	40
Табела 5.1. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија.....	42
Табела 5.2. Састав отпадних вода из различитих фаза производње белог вина.....	45
Табела 5.3. Састав отпадних вода из различитих фаза производње розе вина.....	46
Табела 5.4. Састав отпадних вода из различитих фаза производње црвеног вина.....	47
Табела 5.5. Реолошке карактеристике медијума чија су основа отпадне воде из производње белог вина током биосинтезе ксантана.....	56
Табела 5.6. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина.....	59
Табела 5.7. Реолошке карактеристике медијума чија су основа отпадне воде из.....	65
производње розе вина током биосинтезе ксантана.....	65
Табела 5.8. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина.....	67
Табела 5.9. Реолошке карактеристике медијума чија су основа отпадне воде из.....	73
производње црвеног вина током биосинтезе ксантана.....	73
Табела 5.10. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина.....	74
Табела 5.11. Реолошке карактеристике медијума чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина током биосинтезе ксантана.....	80
Табела 5.12. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина.....	82
Табела 5.13. Реолошке карактеристике медијума са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње белог вина по завршетку биосинтезе ксантана.....	85

Табела 5.14. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње белог вина.....	85
Табела 5.15. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње белог вина.....	86
Табела 5.16. Реолошке карактеристике медијума са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње розе вина по завршетку биосинтезе ксантана .....	88
Табела 5.17. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње розе вина.....	88
Табела 5.18. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње розе вина.....	89
Табела 5.19. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при различитим процесним условима .....	101
Табела 5.20. Анализа варијансе моделованих одзива за биосинтезу ксантана на медијуму формулисаног састава .....	105
Табела 5.21. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај биомасе .....	106
Табела 5.22. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај раствореног кисеоника.....	108
Табела 5.23. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај раствореног кисеоника у култивационој течности вискозитета 35 mPa·s.....	111
Табела 5.26. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај укупног фосфора.....	114
Табела 5.27. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за привидни вискозитет култивационог медијума .....	115
Табела 5.28. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај ксантана.....	116
Табела 5.29. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за молекулску масу ксантана.....	118
Табела 5.30. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за привидни вискозитет раствора ксантана .....	121
Табела 5.31. Оптималне вредности испитиваних параметара и предвиђени одзиви .....	123
Табела 5.32. Поређење експерименталних и моделом предвиђених вредности.....	127
Табела 8.1. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина ..	141
Табела 8.2. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина ....	141

Табела 8.3. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина .....	142
Табела 8.4. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина.....	142
Табела 8.5. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава.....	143
Табела 8.6. Једнофакторијална анализа варијансе садржаја шећера током биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава чија су основа отпадне воде из производње белог вина.....	144
Табела 8.7. Једнофакторијална анализа варијансе садржаја шећера током биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава чија су основа отпадне воде из производње розе вина.....	145
Табела 8.8. Реолошке карактеристике медијума формулисаног састава током биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору.....	146
Табела 8.9. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору на медијумима формулисаног састава.....	146



# СПИСАК СЛИКА

---

Слика 3.1. Карактеристични отпадни токови винарија и фазе производног поступка у којима се генеришу.....	8
Слика 5.1. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина: а) муљање, б) пресовање, в) флотација, г) ферментација, д) претакање.....	53
Слика 5.2. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа отпадне воде из производње белог вина током биосинтезе ксантана.....	57
Слика 5.3. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина: а) муљање, б) пресовање, в) таложење, г) ферментација, д) претакање.....	62
Слика 5.4. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа отпадне воде из производње розе вина током биосинтезе ксантана.....	66
Слика 5.5. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина: а) муљање, б) ферментација и в) претакање.....	70
Слика 5.6. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина током биосинтезе ксантана.....	73
Слика 5.7. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из производње белог (а) и розе (б) вина.....	78
Слика 5.8. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина током биосинтезе ксантана.....	81
Слика 5.9. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава: а) садржај ксантана, б) резидуални садржај шећера, в) молекулска маса ксантана, г) вискозитет раствора ксантана.....	91
Слика 5.10. Ток биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава чија су основа отпадне воде из производње белог (а) и розе (б) вина.....	92
Слика 5.11. Показатељи успешности биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору на медијумима формулисаног састава: а) садржај ксантана, б) резидуални садржај шећера, в) молекулска маса ксантана, г) вискозитет раствора ксантана.....	96

Слика 5.12. Садржај биомасе у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 о/мин), б) интензитет аерације (1,75 л/л/мин), в) температура (30°C) .....	107
Слика 5.13. Садржај раствореног кисеоника у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 о/мин), б) интензитет аерације (1,75 л/л/мин), в) температура (30°C) .....	110
Слика 5.14. Садржај ксантана у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 о/мин), б) интензитет аерације (1,75 л/л/мин), в) температура (30°C) .....	117
Слика 5.15. Молекулска маса ксантана у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 о/мин), б) интензитет аерације (1,75 л/л/мин), в) температура (30°C) .....	119
Слика 5.16. Привидни вискозитет раствора ксантана у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 о/мин), б) интензитет аерације (1,75 л/л/мин), в) температура (30°C) .....	122
Слика 5.17. Зависност појединачне жељене функције од интензитета аерације и брзине мешања при температури од 29,33°C: а) садржај ксантана, б) молекулска маса ксантана, в) вискозитет раствора ксантана .....	124
Слика 8.1. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 1,00 л/л/мин и брзини мешања од 500 о/мин (оглед 1) .....	147
Слика 8.2. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 1,00 л/л/мин и брзини мешања од 500 о/мин (оглед 2) .....	148
Слика 8.3. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 2,50 л/л/мин и брзини мешања од 500 о/мин (оглед 3) .....	149
Слика 8.4. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 2,50 л/л/мин и брзини мешања од 500 о/мин (оглед 4) .....	150
Слика 8.5. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 1,75 л/л/мин и брзини мешања од 200 о/мин (оглед 5) .....	151
Слика 8.6. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 1,75 л/л/мин и брзини мешања од 200 о/мин (оглед 6) .....	152
Слика 8.7. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 1,75 л/л/мин и брзини мешања од 800 о/мин (оглед 7) .....	153
Слика 8.8. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 1,75 л/л/мин и брзини мешања од 800 о/мин (оглед 8) .....	154

Слика 8.9. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,00 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min (оглед 9) .....	155
Слика 8.10. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 2,50 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min (оглед 10).....	156
Слика 8.11. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,00 l/l/min и брзини мешања од 800 o/min (оглед 11).....	157
Слика 8.12. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 2,50 l/l/min и брзини мешања од 800 o/min (оглед 12).....	158
Слика 8.13. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 13).....	159
Слика 8.14. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 14).....	160
Слика 8.15. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 15).....	161
Слика 8.16. Садржај раствореног кисеоника у медијуму вискозитета 35 mPa·s у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 o/min), б) интензитет аерације (1,75 l/l/min), в) температура (30°C) .....	162
Слика 8.17. Садржај шећера у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 o/min), б) интензитет аерације (1,75 l/l/min), в) температура (30°C) .....	162
Слика 8.18. Садржај укупног азота у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 o/min), б) интензитет аерације (1,75 l/l/min), в) температура (30°C) .....	163
Слика 8.19. Садржај асимилабилног азота у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 o/min), б) интензитет аерације (1,75 l/l/min), в) температура (30°C) .....	163
Слика 8.20. Садржај укупног фосфора у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 o/min), б) интензитет аерације (1,75 l/l/min), в) температура (30°C) .....	164
Слика 8.21. Вискозитет медијума у функцији два фактора при константној вредности трећег: а) брзина мешања (500 o/min), б) интензитет аерације (1,75 l/l/min), в) температура (30°C) .....	164

# 1. УВОД

---

Могућности употребе биолошких катализатора у сврху профитом мотивисане производње, која је безбедна по животну средину и генерише биопроизоде који побољшавају квалитет живота и продужавају животни век човека, готово да су неограничене. Потребне тржишта за биопроизводима иницирају њихову производњу у индустријским размерама која последично захтева и значајне количине воде. Стандарди квалитета воде која учествује у производном процесу као компонента медијума су специфични и условљени примењеним биокатализаторима. Како квалитет ове воде одговара квалитету воде за пиће, ограниченост водних ресурса и трошкови припреме воде захтеваног квалитета намећу потребу за проналажењем алтернативних супстрата. С обзиром на састав и биодеградабилни карактер, отпадне воде прехранбене индустрије су потенцијална сировина за биотехнолошку производњу којом би оне биле осиромашене у погледу органских и неорганских извора загађења уз настанак новог биопроизвода.

Индустрија вина традиционално носи велику економску вредност у пољопривредно-прехранбеном сектору. Иако се винарство не сврстава у загађујуће индустрије, током производње вина генеришу се огромне количине отпадних вода које се испуштају у природне реципијенте најчешће без претходне обраде. Отпадне воде винарија карактерише значајно органско и неорганско оптерећење, а услед сезонског начина рада састав и концентрација загађујућих материја у овим ефлуентима веома варијају због чега њихов утицај на животну средину није занемарљив. Све већа потражња за вином широм света, али и код нас довела је до пораста броја винарија, а самим тим и до повећања наведених проблема. Као последица тога развијају се третмани за уклањање загађивача присутних у отпадним водама винарија међу којима су биотехнолошки поступци чији производи имају тржишну вредност одрживо решење.

Бактерије рода *Xanthomonas* на комплексним медијумима у конкретним условима продукују ксантан који је већ дужи низ година најзначајнији индустријски биополимер. Потражња за ксантаном константно се повећава, а процењује се да ће његова тржишна вредност у 2020. години износити 987,7 милиона америчких долара. Производња ксантана је карактеристична по неспецифичности угљенохидратног супстрата, минималним потребама за нутријентима, па чак и погледу количине извора угљеника, као и по малом садржају синтетисаног биополимера у односу на запремину култивационе течности због чега су захтеви за процесном водом огромни. Све наведено обећава да се за биосинтезу овог тржишно вредног биопроизвода могу употребити сировине различитог порекла доступне у великим количинама. С обзиром да је производња ксантана веома захтевна и у погледу регулације процесних параметара одговорних за растворљивост кисеоника велики напори непрестано се улажу у унапређење овог сегмента биопроцеса. Узимајући све наведено у обзир, јавила се идеја за испитивањем могућности производње ксантана на отпадним водама домаћих винарија, али и за оптимизацијом услова биосинтезе са циљем постизања највеће ефикасности биопроцеса што је предуслов индустријализације предложеног производног поступка.

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

---

Основни циљ ове докторске дисертације је оптимизација производње ксантана у лабораторијском биореактору одговарајућих геометријских односа, метаболичком активношћу референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на култивационом медијуму оптималне формулације чија су основа отпадне воде винарија, у погледу процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника. Остварење овако постављеног циља захтева познавање процеса биосинтезе ксантана и природе биокатализатора, специфичних захтева у смислу карактеристика сировина које се могу применити, услова који су од пресудног значаја за успешну реализацију биосинтезе, као и узрока који воде критичним променама култивационог медијума у току извођења биопроцеса.

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

- скрининг могућности биосинтезе ксантана референтним сојем *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на отпадним водама различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина;
- карактеризација отпадних вода различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина;
- испитивање тока биосинтезе ксантана на култивационим медијумима чија су основа отпадне воде различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина;
- формулација састава култивационог медијума за биосинтезу ксантана чија су основа одабране отпадне воде винарија;
- дефинисање математичких модела који описују утицај процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника на показатеље тока, као и на показатеље успешности биосинтезе ксантана, поступком одзивне површине;
- оптимизација вредности процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника методом жељене функције у комбинацији са дефинисаним математичким моделима.

Очекивани резултати ових истраживања, добијени математичким моделовањем и оптимизацијом биопроцеса на основу реалних експерименталних података применом одговарајућих софтверских пакета, су са технолошког аспекта поуздан извор информација за увећање размера предложеног биопроцеса и пројектовање биореактора одговарајућих карактеристика.

### 3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

---

У овом поглављу обједињени су подаци из доступне научне и стручне литературе који се односе на захтеве биотехнолошке производње у погледу количине и квалитета процесне и технолошке воде, могућност употребе отпадних токова винарија као воде која директно учествује у производном процесу, специфичности производње ксантана са акцентом на значај регулације процесних параметара, као и примену статистичких техника за моделовање и оптимизацију биопроцеса. Систематизација прикупљених података и научно доказаних чињеница допринеће бољем разумевању дефинисаног проблема истраживања ове докторске дисертације.

### 3.1. Потреба за водом у биотехнолошкој производњи

Биотехнологија је значајна научна дисциплина која се заснива на примени различитих биокатализатора у сврху профитом мотивисане производње. Иако је позната хиљадама година уназад, и даље се налази у центру интересовања истакнутих истраживача и стручњака, а у бројним земаљама широм света сврстана је међу приоритетне области развоја. Поред унапређења постојећих производних поступака огромна средстава и велики напори константно се улажу у пројектовање нових биопроцеса заснованих на најсавременијим инжењерским концептима. Као резултат тога спектар комерцијалних биопроизвода сваки даном је све шири, а примена биотехнолошких поступака у заштити животне средине све чешћа (Попов, 2007; Бугарски, 2014).

Према доступним подацима у свету постоји више од 4000 биотехнолошких компанија. С обзиром да се тржишна вредност биопроизвода годишње повећава за око 30% намеће се потреба за интензивирањем њихове индустријске производње (Попов, 2007).

Сви биотехнолошки производи, осим у веома ретким случајевима, добијају се субмерзном техником култивације. Извођење оваквих производних поступака, нарочито у индустријским размерама, захтева огромне количине процесне и технолошке воде (Waites et al., 2001). Процесна вода, директно учествује у биопроцесу јер представља главну компоненту медијума, а у прехранбеној индустрији великим делом чини коначан производ. Технолошка вода укључује воду која се користи као расхласни, грејни или транспортни флуид, воду за напајање парних котлова, за одржавање хигијене у погону и слично (Барас и сар., 2009).

Захтеви биотехнолошке производње у погледу квалитета процесне воде су специфични и условљени примењеним биокатализаторима. За припрему производних медијума употребљавају се водоводска или бунарска вода квалитета воде за пиће (Пејин, 2003; Барас и сар., 2009). С обзиром да су артерски бунари веома распрострањени на територији АП Војводине велики број индустријских погона лоцираних на овом подручју снабдева се водом из сопствених извора (Далмација, 2010). Међутим, без обзира на употребљен извор воде, неопходно је извршити проверу њеног квалитета и, уколико је потребно, спровести адекватан поступак прераде како би се добила микробиолошки исправна вода одговарајућег хемијског састава (Ђурић, 2015).

Имајући у виду ограниченост водних ресурса, као и огромне трошкове припреме воде захтеваног квалитета јасно је да је и припрема медијума за биотехнолошку производњу све скупља што негативно утиче на економичност примењеног производног поступка. Како би се побољшала економска конкурентност биопроцеса предлаже се, кад год је то могуће, поновна употреба већ коришћене воде. На овај начин отпадни токови једне гране индустрије постају сировина друге при чему се добија нов производ, а смањује количина ефлуената коју је потребно обрадити пре испуштања у животну средину (Waites et al., 2001).

Ако се узме су обзир природа сировина и готових производа, отпадне воде које генерише прехранбена индустрија имају биоразградиви карактер што их чини потенцијалним супстратом за биотехнолошку производњу. Могућност примене ових отпадних токова за добијање биопроизвода огледа се управо у њиховом саставу, и то првенствено у погледу великог садржаја органских и неорганских материја које представљају нутријенте за различите биокатализаторе. Чак и када нису значајно оптерећене, отпадне воде прехранбене индустрије могле би се применити као замена за процесну воду јер су потребе биотехнолошке производње савременог доба за водом одговарајућег квалитета значајно повећане услед пораста њихових производних капацитета. Уколико својим саставом наведени ефлуенти не ометају метаболичку активност биокатализатора њихова употреба у биотехнолошкој производњи је оправдана (Waites et al., 2001).

Како би се отпадни токови прехранбене индустрије могли успешно користити у биотехнолошкој производњи као компоненте култивационих, односно ферментационих медијума потребно је да задовоље што више критеријума. На првом месту то су трошкови сировина и њиховог транспорта, доступност сировина, уједначеност квалитета и лака стандардизација припреме медијума, одговарајући хемијски састав, присуство релевантних прекурсора, жељена производна способност биокатализаора, као и што једноставније одлагање отпада који настају њиховом обрадом биотехнолошким путем (Timoschenko, 1999; Waites et al., 2001).

Идеалне сировине за биотехнолошку производњу треба да су што јефтиније, уједначеног квалитета и доступне током целе године. Јасно је да цена сировина утиче на конкурентност цене финалног производа, а томе доприносе и трошкови њиховог транспорта. С обзиром да су разматрани супстрати углавном отпадни токови из других производних погона економски аспекти њихове примене су задовољени, а ако су и сви остали услови испуњени допремају се са што ближег извора. Уколико су сировине сезонског карактера потребно је обезбедити одговарајуће услове складиштења како чувањем у дужем временском периоду не би дошло до промене њиховог састава. Од свих, нарочито у индустријским размерама, најтеже се одржавају температурни услови (Waites et al., 2001).

Уједначеност квалитета је значајна карактеристика сировина јер од ње у великој мери зависи стандардизација припреме медијума. Константност сировинског материјала је пожељна и како би се осигурао униформни квалитет коначног производа, а самим тим и задовољство купаца. Стога се свака нова серија ефлуената анализира у погледу најзначајнијих параметара за биотехнолошку производњу, а њена примењивост у конкретном производном поступку проверава се извођењем биопроцеса у лабораторијским условима. Сировине екстремно варијабилног квалитета су непожељне јер изискују додатне трошкове (Waites et al., 2001; Савић, 2007).

Пожељно је да сировине за биотехнолошку производњу садрже што више потребних нутријената. Првенствено, то су извори угљеника, азота, фосфора, али и минералне материје, витамини и, у специфичним случајевима, одговарајући прекурсори. Међутим, само присуство наведених састојака није довољно за успешно извођење биопроцеса. Веома је важно да буду усвојиви од стране одабраних биокатализатора, као и да у коришћеним сировинама не постоје компоненте са токсичним деловањем на њихову метаболичку активност. Припрема медијума за биотехнолошку производњу подразумева анализу сировинског материјала, а затим његово разблаживање и/или обогаћивање одређеним компонентама како би се постигао оптималан састав за стабилну биосинтезу жељеног метаболита очекиваног квалитета. Будући да је стерилизација неопходна фаза у припреми производних медијума избегава се употреба сировина чији се састојци денатуришу на повишеним температурама (Waites et al., 2001; Савић, 2007).

Од састава и природе коришћених сировина зависе и примењени услови производње. Наиме, уколико су сировине изузетно богате протеинима интензитет аерације и брзину мешања треба подесити тако да не дође до израженог пенушања медијума, а да пренос масе кисеоника буде одговарајући. Поред тога, поједине компоненте сировина могу да отежавају поступке издвајања и пречишћавања жељеног производа (Waites et al., 2001).

Поред жељеног, током извођења биопроцеса може настати и низ међу- и нуспроизвода. Стога се савремени биотехнолошки процеси пројектују са циљем да се количина свих споредних производа сведе на минимум. Често се прибегава и њиховом искоришћењу у истом производном поступку што има двоструку корист, смањење укупне потребне запремине процесне воде, али и количине отпадних токова које је потребно обрадити пре одлагања у природне реципијенте (Waites et al., 2001).



## 3.2. Отпадне воде винарија као сировине за биотехнолошку производњу

Производња вина је значајна грана индустрије која традиционално носи велику економску вредност у пољопривредно-прехрамбеном сектору. Иако винарство нема репутацију загађујуће гране индустрије, током прераде гроздја са циљем добијања вина генеришу се огромне количине чврстог и течног отпада које носе значајно органско и неорганско оптерећење (Mosse et al., 2011). У прошлости произвођачи вина бавили су се и додатним активностима које су им дозвољавале да рециклирају настале отпадне токове. Традиција и искуство научили су их да ништа није отпад те да сваки нуспроизвод може постати ђубриво, сточна храна или гориво. Међутим, данас је ситуација умногоме другачија. Савремени виноградар и винари специјализовани су у само једном сектору. Индустријализацијом производње вина традиционално вредни напаци замењени су комерцијалним производима ниске тржишне цене. Поред тога, све већа потражња за вином широм света, али и код нас довела је до отварања нових винарија, увођења модерних технолошких поступака и повећања производних капацитета што за последицу има експоненцијални раст количине насталог отпада. Већина устаљених начина коришћења отпадних токова винарија је потиснута или у потпуности заборављена трансформишући тако ефлуенте који се генеришу приликом производње вина у отпад (Nerantzis and Tataridis, 2006; Montalvo et al., 2010).

Последњих неколико деценија последице интензивног одлагања отпадних токова из производње вина у природне екосистеме без њихове претходне обраде постају све израженије. Најзначајнији негативни утицаји винарија на животну средину су загађење вода, деградација земљишта, уништавање вегетације, као и испуштање непријатних мириса и гасова, што је резултат праксе неконтролисаног одлагања течних и чврстих отпадних токова. Такође, не сме се заборавити ни бука пумпи, хладњака, дробилица и друге опреме винарија, али ни бука возила, посебно током периода бербе (EPA, 2004).

Будући да је испуштање непречишћених ефлуената индустрије вина у животну средину еколошки неприхватљиво потребно је придржавати се прописаних стратегија за управљање отпадом (Oliveira and Duarte, 2014). У циљу побољшања квалитета животне средине дефинисани су основни принципи управљања међу којима је поновна употреба отпадних токова тренутно једно од најпопуларнијих решења (Mosse et al., 2011). Са напретком модерне биотехнологије предложени су нови технолошки поступци за поновно коришћење чврстог отпада винарија не само у пољопривреди већ и за производњу различитих тржишно вредних биопроизвода (Nerantzis and Tataridis, 2006). Међутим, један од главних проблема винарства је управљање великим количинама отпадних вода (Mosse et al., 2011). Иако су развијени бројни, углавном аеробни третмани за уклањање загађујућих материја присутних у овим отпадним токовима ниједан од њих није доживео адекватан успех. Један од могућих разлога за то је што конструисана постројења садрже аерационе танкове великих запремина управо због огромних количина ефлуента које треба прерадити током периода бербе док је у другим периодима године тешко управљати са њима. Ипак, највећи недостатак примене аеробних третмана је хиперпродукција активног муља којег је, такође, потребно негде одложити (Oliveira and Duarte, 2014). Дакле, како се у већини случајева отпад из једног облика преводи у други, актуелни начини обраде отпадних вода винаријама не доносе никакву корист због чега производња вина постаје економски и еколошки неодржива (Zhang et al., 2008).

Имајући у виду све наведено намеће се потреба за развојем одговарајућег биотехнолошког поступка којим би се органске и неорганске материје присутне у отпадним водама винарија конвертовале у неки вредан биопроизвод. Томе претходе обимна истраживања која првенствено

укључују комплетну карактеризацију ових отпадних токова. Подаци о саставу и количини отпадних вода које се генеришу током производње вина пружили би јасан увид у доступност и квалитет отпадних вода винарија као сировина за биотехнолошку производњу.

### 3.2.1. Карактеризација отпадних вода винарија

Током производње вина генеришу се огромне количине значајно оптерећених отпадних вода. Подаци о запремини и саставу ових отпадних токова различити су међу винаријама, али и у оквиру исте винарије од године до године, а зависе од производне активности (берба грожђа, ферментација шире или кљука, претакање, бистрење, филтрирање и флаширање вина), величине винарије (малог, средњег или великог капацитета), врсте вина које се производи (бела, розе, црвена или специјална вина), као и од примењеног технолошког поступка, односно од јединственог стила винарства (Conradie et al., 2014; Ioannou et al., 2015). Поред тога, велика је варијација међу ефлуентима насталим и на дневном нивоу, како у погледу квантитативних тако и по квалитативним карактеристикама, чинећи евалуацију дневног загађења веома комплексном (Strong, 2008).

Како би се у потпуности сагледали еколошки проблеми које изазива испуштање отпадних токова индустрије вина у животну средину, али и пронашао одговарајући третман за смањење укупног оптерећења, од изузетног је значаја детаљно окарактерисати наведене ефлуенте. Комплетна карактеризација отпадних вода винарија подразумева лоцирање места у производном погону у којима се генеришу, мерење или бар процену насталих количина, као и одређивање параметара којима се утврђује органско оптерећење, киселост, салинитет и нутритивни ниво (Day et al., 2011).

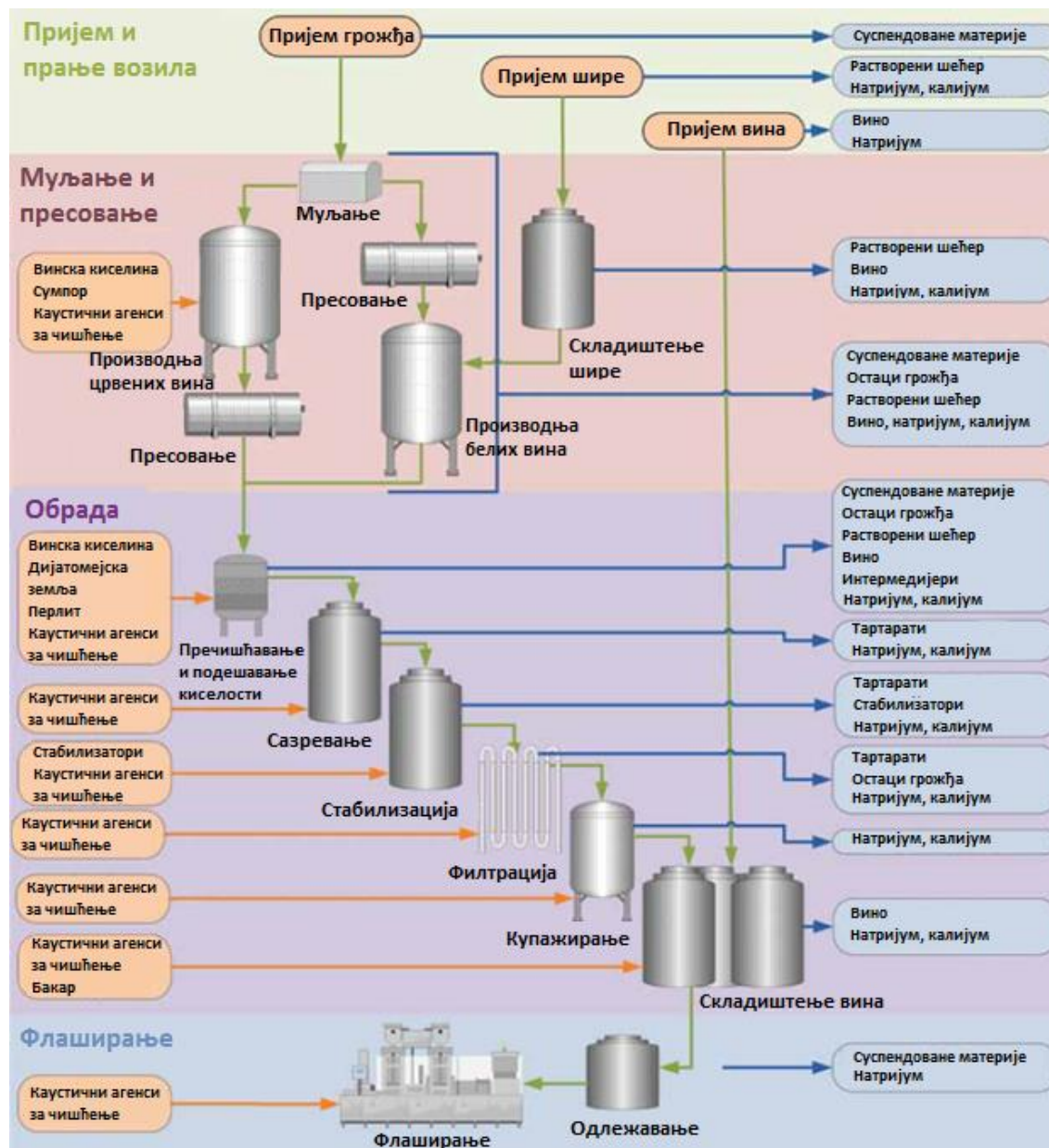
#### 3.2.1.1. Порекло отпадних вода винарија

Отпадне воде винарија углавном потичу из операција прања радних површина, опреме и амбалаже спроведених током различитих фаза процеса производње вина, али и из расхладних система. Дакле, то су воде од прања танкова, буради, флаша, подова и опреме, међу којима су муљаче, пресе, ферментациони танкови, али и јоноизмењивачке колоне и филтрационе јединице, као и од испирања трансфер линија. У отпадне воде винарија спадају и неквалитетно вино и случајни губици производа, лабораторијска отпадна вода и атмосферска вода које је преусмерена и/или доспела у систем управљања отпадним водама (EPA, 2004).

Отпадне воде винарија се према пореклу генерисања у одређеним фазама производње вина могу поделити на (Brito et al., 2007):

- отпадне воде настале током припреме за бербу (прање гајби, опрема за прераду грожђа, дезинфекција дрвених буради, итд.),
- отпадне воде настале током пријема и примарне прераде грожђа (прање гајби и возила које служе за транспорт грожђа из винограда, прихватних судова, муљача, преса, транспортних пумпи, итд.),
- отпадне воде настале током винификације (испирање ферментационих танкова и судова за бистрење, прање подова у винарији, са или без средстава за прање),
- отпадне воде настале током претакања вина (испирање танкова након претакања вина, прање пумпи и транспортних црева, прање подова у винарији, са или без средстава за прање) и
- отпадне воде настале током филтрирања вина (испирање киселгура и других филтрационих материјала).

На слици 3.1. (Day et al., 2011) шематски је приказан поступак добијања белих и црвених вина са назначеним фазама производње у којима долази до генерисања чврстих и течних ефлуената. Такође, за сваку фракцију отпада наведене су компоненте које су у највећој мери одговорне за повећање органског, односно неорганског оптерећења.



Слика 3.1. Карактеристични отпадни токови винарија и фазе производног поступка у којима се генеришу

### 3.2.1.2. Количина отпадних вода винарија

Производња вина је једна од грана прехранбене индустрије код којих је производна активност сезонски дефинисана. Врхунац производње је у јесењим месецима када се обавља берба грозђа и ферментација шире или кљука, док се следеће значајније радње дешавају тек на пролеће приликом претакања, бистрења и филтрирања вина. Током зиме и лета активности у винаријама су сведене на минимум (Brito et al., 2007). Иако се отпадне воде генеришу током целе године, запремина и количина загађења веома варијају у зависности фазе производње која је у току. У

периоду пре бербе одвија се чишћење подрума и опреме, али и припрема за бербу. Због прања опреме које се у току периода бербе обавља свакодневно постоји већа потражња за чистом водом. Након бербе, хигијена је и даље један од главних приоритета, упркос смањењу количине воде која се користи, а у периоду након бербе могући су и дани без употребе воде у винском подруму. У зимским месецима, а нарочито током кишне сезоне, веома је важно да су атмосферске воде одвојене од индустријских како би се спречило повећање количине воде коју је потребно третирати (Conradie et al., 2014). У табели 3.1. (van Schoor, 2005) наведени су могући утицаји одређених фаза производње вина на количину отпадне воде која се генерише, али и на њен квалитет.

Табела 3.1. Утицај фаза у производњи вина на квантитет и квалитет отпадних вода

Фаза у производњи вина	Утицај на квантитет	Утицај на квалитет
<b>ВОДА ЗА ПРАЊЕ</b>		
Алкално прање и неутрализација	до 33%	Повећање вредности рН и COD, као и садржаја натријума и калијума
Вода за испирање (танкова, подова, трансфер линија, флаша, буради итд.)	до 43%	Повећање COD, као и садржаја натријума, фосфора и хлора
<b>ПРОЦЕСНА ВОДА</b>		
Филтрација	до 15%	Повећање садржаја разних контаминаната
Ацидификација и стабилизација вина	до 3%	Присуство сумпорне киселине или натријум-хлорида
Отпад расхладног торња	до 6%	Повећање садржаја различитих соли
<b>ОСТАЛИ ИЗВОРИ</b>		
Лабораторијска пракса	до 5-10%	Варијација вредности рН, повећање садржаја соли

Генерално, индустрија вина генерише значајне количине чврстог и течног отпада од којих чак 75% чине отпадне воде. Доступни литературни подаци указују да технолошке операције које се примењују у производњи вина доводе до настанка сличних, па чак и већих количина отпадних вода од количине произведеног вина. Запремина отпадних вода винарија најчешће варира у интервалу од 0,5-14,0 l/l произведеног вина, а често се сусреће податак да се током производње 1000 l вина генерише количина загађења еквивалентна загађењу које продукује 100 људи. Одбачене количине вина учествују у укупној запремини отпадних вода винарија са променљивим уделом, а варирају од једног до другог винског подрума при чему се неке просечне вредности налазе у опсегу од 0,1-0,4 l/l произведеног вина (Brito et al., 2007; Ioannou et al., 2015).

Количину отпадних вода винарија у највећој мери одређују количина прерађеног грожђа и дужина периода бербе. Дакле, што је већа запремина шире, односно кљука који се ферментисе већа је и количина генерисане отпадне воде, а што берба дуже траје повећава се период у коме ови отпадни токови настају. Најчешће период бербе почиње средином или крајем августа, а траје од 42 до 140 дана што зависи од сорти грожђа које се прерађују и врсте вина која се производе у конкретној винарији. Значајно је напоменути да се током овог периода настаје око 50-80% укупне

количине отпадних вода коју винарија генерише на годишњем нивоу (NSD, 2009). Наведени удели отпадних вода које се генеришу током периода бербе у односу на укупно настале течне ефлуенте веома варирају у зависности од производних капацитета винарија. У винаријама средњих до великих капацитета годишње настаје више од 15000 hl течних ефлуената од којих се 50% генерише у току периода бербе. Међутим, код малих винарија ситуација је нешто другачија. Иако генеришу мање од 15000 hl отпадних вода годишње чак 80% наведених количина испуштају за време бербе грожђа и ферментације шире, односно кљука (van Schoor, 2005).

Поражавајућа је чињеница да већина данашњих винарија нема документоване податке који се односе на тачне количине отпадних вода које генеришу. Чак и када располажу неким информацијама оне су засноване на оквирним проценама према запремини утрошене воде. Због све веће забринутости за животну средину овлашћени органи већ дужи низ година апелују да, кад год је то могуће, произвођачи вина мере количину отпадних вода коју испуштају у природне екосистеме, како би се олакшао развој одговарајућег третмана којим би се минимизовали значајни еколошки проблеми изазвани неконтролисаним одлагањем ових отпадних токова. У те сврхе могу се користити различити мерачи протока уз испуњен услов да су правилно калибрисани. Ипак, за мерење количине отпадних вода винарија као најбољи препоручују се магнетски мерачи управо због своје тачности и минималним потребама за одржавањем, као и због могућности мерења прототка отпадних вода са високим садржајем чврстих материја које би блокирале традиционалне механичке мераче. Значајно је напоменути и да се количина отпадних вода винарија мора мерити након што су отпадне воде прикупљене и третиране, односно пре него што су одложене или поново употребљене. Мерење запремине генерисаних отпадних вода мора бити синхронизовано са праћењем њиховог квалитета како би се прикупили сви подаци који указују на количину, али и састав загађујућих материја (EPA, 2004; van Schoor, 2005).

### 3.2.1.3. Састав отпадних вода винарија

Како би се пронашао одговарајући третман за осиромашење отпадних вода индустрије вина у погледу органских и неорганских извора загађења веома је важно познавање њиховог састава. Међутим, када се разматра могућност поновне употребе отпадних токова у биотехнолошкој производњи квалитативна карактеризација је од пресудног значаја (Bustamante et al., 2005; Conradie et al., 2014). Да би се што прецизније одредила количина загађивача који се испуштају у животну средину, материјал узет за анализу мора да одражава квалитет отпадних вода генерисаних у току фазе производње када је количина отпадних материја највећа. Такође, узорковање се мора извршити на одговарајућем месту како би се добили што репрезентативнији подаци (EPA, 2004).

Главни извори загађења животне средине присутни у течним ефлуентима из производње вина су (Brito et al., 2007):

- остаци из процеса производње, попут делова бобица грожђа (петелке, семенке, покожица), муља, талоба квасца и каменца,
- шира и вино случајно изгубљени током производње, вино лошијег квалитета, покварено вино и вино које доспева у отпадну воду током прања погона и опреме у винаријама,
- производи који се користе за третирање вина у циљу побољшања његових сензорних карактеристика, као што су средства за бистрење (бентонит, желатин, силицијум-диоксид) и филтрациони материјал, као и
- производи за чишћење и дезинфекцију од којих се најчешће користе натријум-хидроксид и калијум-хидроксид.

Осим наведеног, отпадне воде винарија садрже све карактеристичне компоненте грозђа и вина, као што су шећери (глукоза и фруктоза), азот, фосфор, етанол, глицерол, естри, органске киселине (лимонска, винска, јабучна, млечна и сирћетна киселина) и једињења великих молекулских маса попут полифенола, танина и лигнина (Bustamante et al., 2005;). Већина ових састојака је лако биоразградива, изузев фенолних једињења који у концентрацијама од 60 mg/l до 225 mg/l отежавају биодеградацију јер захтевају посебно адаптирану микрофлору (Brito et al., 2007).

Анализом параметара којима се уобичајено карактеришу индустријски ефлуенти утврђено је да је састав генерисаних отпадних вода значајно другачији међу винаријама са различитих локалитета што у великој мери компликује проналазак општег решења за уклањање загађујућих материја. У табели 3.2. (Mosse et al., 2011) систематизовани су подаци који потврђују да су отпадни токови индустрије вина неуједначеног квалитета.

Отпадни токови које генерише индустрија вина су претежно киселог карактера што је последица испуштања шире и/или вина чија је вредност рН од 3,5 до 5,5 (Chapman et al., 2001). Хемијском анализом састава отпадних вода винарија утврђено је да су органске киселине компоненте које су у највећој мери одговорне за киселост ових ефлуената (Agustina et al., 2008). Међутим, у случајевима када се за прање опреме, танкова и погона користе изразито алкална средства, као и при хемијском уклањању тартарата, вредност рН течних ефлуената из производње вина може бити и у базном подручју (Brito et al., 2007).

Већина загађујућих материја у отпадним водама винарија је органског порекла, и то чак 80-85%, због чега је садржај органског оптерећења један од најважнијих параметара ових отпадних токова (Conradie et al., 2014). Може се изразити као хемијска потрошња кисеоника (COD, енгл. Chemical Oxygen Demand), биохемијска потрошња кисеоника (BOD<sub>5</sub>, енгл. Biochemical Oxygen Demand) или као укупан органски угљеник (ТОС, енгл. Total Organic Carbon). За разлику од биохемијске, хемијска потрошња кисеоника се одређује редовније јер је у питању анализа која је поуздана, а уједно веома брза и јефтина. Такође, између наведених параметара могу се дефинисати линеарне зависности које веома варирају као резултат деловања више различитих фактора, али неким општим релацијама сматрају се BOD<sub>5</sub>=0,65·COD и BOD<sub>5</sub>=2,9·ТОС (Day et al., 2011).

Органске материје присутне у отпадним токовима винарија су пореклом из грозђа и вина и најчешће су биоразградивог карактера (Zhang et al., 2008). Биоразградивост индустријских ефлуената углавном се процењује на основу односа BOD<sub>5</sub>/COD. Уколико је поменути однос већи од 0,5 уклањање загађујућих материја органског порекла биолошким третманима је у највећем броју случајева веома успешно, али уколико је однос BOD<sub>5</sub>/COD мањи од 0,2 биодеградација поменутих компоненти значајно је отежана (Chan et al., 2009). Биоразградивост течних ефлуената који се генеришу током производње вина је највећа током периода бербе због највећег присуства лако усвојивих једињења (Oliveira et al., 2009).

Утврђено је да 90% органских компоненти отпадних вода индустрије вина чини етанол, осим током бербе када су то углавном шећери (Agustina et al., 2008). Од ферментабилних шећера у отпадним токовима који се генеришу током производње вина присутни су глукоза и фруктоза, док се врло ретко може детектовати и малтоза (Malandra et al., 2003) Значајним варијацијама у саставу органског материјала доприносе и неконтролисани хемијске реакције које се одвијају у овим ефлуентима (Conradie et al., 2014).

Отпадне воде винарија садрже углавном мале количине азота и фосфора, са односом BOD<sub>5</sub>/N/P од 100,0/1,0/0,3. Нешто већи садржај ових нутријената је забележен у отпадним водама које се генеришу током бербе и примарне прераде грозђа (Brito et al., 2007).

Табела 3.2. Карактеризација отпадних вода винарија

Параметар	Минимум	Максимум	Просек
pH (1)	3	12	5
EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	800	3100	1925
TSS (mg/l)	0	30300	760
COD (mg/l)	320	296119	15553
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	125	130000	8858
ТОС (mg/l)	400	2500	1349
Укупни феноли (mg/l)	0	1450	292
Укупни шећери (g/l)	0	13	3
Фруктоза (g/l)	0	2	1
Глукоза (g/l)	0	3	1
Малтоза (g/l)	0	13	7,2
Лимунска киселина (mg/l)	0	2	1
Винска киселина (mg/l)	0	530	209
Јабучна киселина (mg/l)	0	70	25
Млечна киселина (mg/l)	0	350	177
Сирћетна киселина (mg/l)	0	663	179
Ћилибарна киселина (mg/l)	40	80	60
Пропионска киселина (mg/l)	0	67	13
Етил-ацетат (mg/l)	2	43	10
Етанол (g/l)	1	5	2
Метанол (mg/l)	0	15	2
Бутанол (mg/l)	0	1	1
Пропанол (mg/l)	0	2	1
Глицерол (mg/l)	140	320	218
Укупан азот (mg/l)	0	415	110
Укупан фосфор (mg/l)	3	188	52
Натријум (mg/l)	7	470	204
Калијум (mg/l)	29	353	201
Калцијум (mg/l)	26	2203	286
Магнезијум (mg/l)	16	87	33
Гвожђе (mg/l)	1	77	12
Манган ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	<200	1740	310
Бакар ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	<200	3260	790
Цинк ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	90	1400	580
Кобалт ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	110	300	170
Хром ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	<200	720	150
Кадмијум ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	50	80	60
Олово ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	550	1340	1090
Никал ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	<200	650	120

Састав неорганских једињења у течним ефлуентима винарија у највећој мери (до 76%) зависи од коришћених средстава за чишћење, осим калијума, који је присутан у високој концентрацији и у шири. Најчешће се за одржавање хигијене погона и подрума користе изразито алкална средства, попут натријум-хидроксида и калијум-хидроксида која су добра за улањање тартарата. Међутим, винарије које користе препарате на бази натријума имају проблема са салинитетом отпадних вода уколико се оне користе за наводњавање (Conradie et al., 2014). Од неорганских једињења присутни су још и јони магнезијума и калцијума, као и хлориди, сулфати и карбонати који такође значајно утичу на салинитет отпадних вода винарија. Минералне материје су у ове отпадне токове доспеле чишћењем са алкалним агенсима или водом лошег квалитета (Charman et al., 2001).

### 3.2.2. Управљање отпадним водама винарија у Републици Србији

Виноградарско географско производно подручје у којем постоје повољни услови за гајење винове лозе обухвата територију целе Републике Србије, а састоји се од три региона, и то виноградарског региона Централна Србија, виноградарског региона Војводина и виноградарског региона Косово и Метохија. У оквиру ова три виноградарска региона налазе се 22 рејона са 77 виногорја и више виноградарских оаза (Јакшић и сар., 2015).

Према подацима Министарства пољопривреде и заштите животне средине, на територији Републике Србије тренутно је регистровано 369 тржишно оријентисаних винарија, од чега је 225 винарија у виноградарском региону Централна Србија, 139 винарија у виноградарском региону Војводина и 5 винарија у виноградарском региону Косово и Метохија. Треба напоменути да у Србији, поред наведених комерцијалних винарија, постоји и велики број малих породичних произвођача који производе вино за сопствене потребе (Јакшић и сар., 2015).

Подаци из Винарског регистра указују да је број великих винарија у Србији, са више од 250 запослених, мали, односно постоје свега две такве винарије, док групи винарија које имају од 50 до 250 запослених припада само једна винарија, иако по количини произведеног вина заузимају велики удео у укупној производњи. С обзиром да средњих винарија, са бројем запослених од 10 до 49 у Србији има 23, јасно је да мале винарије, са мање од 10 запослених, чине најбројнију групу произвођача вина у нашој земљи (Јакшић и сар., 2015).

Виноградарски регион Војводина обухвата седам рејона од којих је најзначајнији Сремски. У оквиру Сремског рејона постоји само једно виногорје, и то Фрушкогорско виногорје. Са више од педесет винарија регистрованих за комерцијалну производњу вина, овај рејон је по броју винарија један од водећих у Србији. Поред тога, скоро свако породично газдинство на Фрушкој Гори поседује мање винограде и производи сопствено вино (Јакшић и сар., 2015).

Према подацима Републичког завода за статистику производња вина у Републици Србији је у константном порасту. У 2015. години у домаћим винаријама је произведено 241040 hl вина што је за око 6% више у односу на петогодишњи просек. Имајући у виду наведене податке, као и чињенице да количина укупних отпадних вода винарија која настаје по литри произведеног вина варира у веома широком интервалу и да оне носе значајно органско и неорганско оптерећење, очигледно је да се у нашој земљи генеришу незанемарљиве количине отпадних токова који, када се без претходног третмана испуштају у животну средину, деградирају њен квалитет.

Према Правилнику о категоријама, испитивању и класификацији отпада, који важи на територији Републике Србије, а објављен је у "Службеном гласнику РС", бр. 56/10 од 18.08.2010. године, биоразградиви отпад, какав је отпад из винарија, сврстан је у категорију 02. Ово указује да је



одлагање непречишћених отпадних вода које настају током производње вина у водене екосистеме еколошки неприхватљиво. Стога су Уредбом о граничним вредностима емисије загађујућих материја у воде и роковима за њихово достизање, која је објављена је у "Службеном гласнику РС", бр. 48/12 од 11.05.2012. године, дефинисане вредности значајних параметара које отпадне воде из објеката и потројења за производњу алкохолних пића и алкохола морају минимално да садрже пре испуштања у поршинске воде или јавну канализацију, а које су наведене у табели 3.3. Међутим, услед незадовољавајуће економске ситуације у земљи, али и недовољно развијене еколошке свести домаћих произвођача мало је оних производних погона из којих отичу ефлуенти прописаног састава.

Табела 3.3. Граничне вредности емисије на месту испуштања у површинске воде

Параметар	Гранична вредност емисије
Температура (°C)	30,0
pH (1)	6,5-9,5
TSS (mg/l)	35,0
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	25,0
COD (mg/l)	110,0
Амонијак (mg/l)	10,0
Укупан фосфор (mg/l)	2,0
Укупан неоргански азот(mg/l)	18,0

### 3.2.3. Примена отпадних вода винарија у биотехнолошкој производњи

Будући да су течни ефлуенти који се генеришу током производње вина богати биоразградивим материјама и нутријентима (табела 3.2) представљају потенцијално вредне супstrate за биотехнолошку производњу. Међутим, и поред тога, у доступној научној и стручној литератури нема значајних навода који се односе на поновну употребу отпадних вода винарија у биотехнологији. Узрок томе може бити присуство значајних количина полифенолних компоненти које делују инхибиторно на метаболизам већине биокатализатора што у великој мери отежава обраду течних ефлуената индустрије вина биотехнолошким путем (Brito et al., 2007).

До сада су публиковани резултати само једних истраживања у којима су ови отпадни токови коришћени као сировина у биотехнолошкој производњи и то, у конкретном случају, за умножавање фунгалне биомасе богате протеинима (Zhang et al., 2008). Иако су добијени охрабрујући резултати, наставак истраживања није реализован те је једини покушај да се развије биотехнолошки поступак за третман отпадних вода винарија заустављен на лабораторијском нивоу. Разлог за то могу бити управо карактеристике самих сировина које су поред специфичног и веома променљивог састава, нарочито у погледу концентрације загађујућих материја, током године доступне у веома неравномерним количинама услед сезонског начина рада. Имајући то у виду јасно је да примена отпадних вода винарија у биотехнолошкој производњи може бити оправдана само конструкцијом централизованог постројења у којем ће на тренутно расположивим ефлуентима одабрани биокатализатор продуковати жељени производ у довољним количинама.

### 3.3. Биотехнолошка производња ксантана

Биполимери су хетерогена група нетоксичних биоразградивих полисахарида. Углавном су природног порекла, иако су неки од њих хемијски модификовани у циљу добијања једињења жељених карактеристика. Поред уобичајено примењиваних биљних полисахарида, последњих деценија пажња научне јавности усмерена је на полисахариде микробиолошког порекла. С обзиром да су микробиолошки полисахариди веома интересантни биоматеријали са широким могућностима примене огромна средства и велики напори константно се улажу у унапређење њихове производње. И поред тога што велики број микроорганизама поседује способност биосинтезе полисахарида само неколико биополимера микробиолошког порекла има индустријску примену (Öner, 2013).

Ксантан или ксантан гума је један од природних хетерополисахарида микробиолошког порекла. Овај веома вредан биополимер је екстрацелуларни секундарни метаболит бактерија рода *Xanthomonas*. Захваљујући специфичним реолошким карактеристикама које су у директној вези са јединственом хемијском структуром, ксантан се из групе микробиолошких полисахарида издваја као комерцијално најзначајнији (Becker et al., 1998).

Овај значајан индустријски биополимер откривен је током педесетих година двадесетог века као резултат пројекта реализованог у лабораторијама истраживачког центра из Сједињених Америчких Држава (тадашњи Northern Regional Research Laboratories, који је данас променио име у The National Center for Agricultural Utilization Research) који је за циљ имао идентификацију микроорганизама способних да синтетишу полимерне материјале растворљиве у води. Биополимер настао метаболичком активношћу бактерија рода *Xanthomonas* због својих изузетних структурних и функционалних својстава и даље је у центру интересовања великог броја истраживача (Born et al., 2005; Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Биотехнолошка производња ксантана у индустријским условима први пут је изведена још 1960. године, а као коначан производ на тржишту је доступан од 1964. године (Born et al., 2005). Од тада потражња за овим биополимером константно се повећава, а према извештају компаније Grand View Research Inc. процењује се да ће његова тржишна вредност у 2020. години износити 987,7 милиона америчких долара. Тренутно најзначајнији произвођачи ксантана су Merck, Kelco и Pfizer (САД), Rhone Poulenc, Mero-Rousselot-Santia и Sanofi-Elf (Француска), Saily Chemical (Кина) и Jungbunzlauer (Аустрија) (Faria et al., 2011).

У индустријским размерама ксантан се производи употребом чисте бактеријске културе на хранљивој подлози одговарајућег састава у оптималним условима, дисконтинуално, субмерзном аеробном биосинтезом. Биотехнолошка производња ксантана састоји се из више производних фаза, које су се значајно технолошки промениле и усавршиле од времена почетка његове индустријске производње. Ово усавршавање је вођено константном тежњом да се постигне што већи принос и квалитет биополимера уз минималне трошкове производње. Међутим, иако је производња овог бактеријског полисахарида још увек релативно скупа у односу на производњу полисахарида биљног порекла, као што су алгинати, поседује низ предности. Једна од њих је свакако то што квалитет биосинтетисаног ксантана може бити обезбеђен ако се производни поступак изводи у тачно дефинисаним условима. На тај начин остварује се и максимална продукција, као и висок степен конверзије супстрата (Becker et al., 1998; Додић, 2000).

Као и код свих биотехнолошких процеса, успешност биосинтезе ксантана у великој мери зависи од неколико фактора, и то генетског потенцијала производног микроорганизама и његовог одржавања, састава хранљивих подлога и култивационих медијума, услова под којима се

биопроцес одвија, међу којима су посебно значајни они који су одговорни за садржај раствореног кисеоника, веома зависи и од примењене технике и опреме за производњу, као и од поступака издвајања готовог производа (Додић и Граховац, 2013).

Премда је на први поглед производња овог микробиолошког полисахарида веома развијена и даље има простора за додатно унапређење биотехнолошког поступка производње. Правци у којима треба да се крећу истраживања да би се овај циљ постигао су конструкција нових биореактора у којима се остварује бољи пренос масе и енергије, варирање процесних услова и испитивање различитих отпадних ефлуената као алтернативних супстрата (Becker et al., 1998).

### 3.3.1. Структура молекула и функционалне карактеристике раствора ксантана

Ксантан је полианјонски хетерополисахарид веома сложене хемијске структуре. Квалитативни и квантитативни састав молекула ксантана утврђен је још 1975. године испитивањем биополимера кога продукује сој *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 (NRRL B-1459). Молекул ксантана сачињавају D-глюкоза, D-маноза и D-глукуронска киселина у молском односу 2:2:1. Поред ових моносахаридних јединица у молекулу ксантана налазе се ацетил- и пируват- остаци у варирајућем односу (Jansson et al., 1975; Rosalam and England, 2006).

Сваки други остатак глукозе целулозног основног низа носи трисахаридни бочни низ који је оријентисан паралелно са њим. Нековалентне унутармолекулске везе између ових низова стабилизују конформацију једноструке завојнице (Rosalam and England, 2006).

Молекулска маса комерцијално доступног ксантана је веома велика, а налази се у интервалу од  $3 \cdot 10^7$  g/mol до  $5 \cdot 10^7$  g/mol (Li et al., 2016). Разлике у молекулској маси последица су различите хемијске структуре синтетисаног биополимера. Фактори који утичу на структуру молекула ксантана, а самим тим и на његову молекулску масу су примењени производни сој, састав хранљиве подлоге и процесни услови при којима се биосинтеза одвија (García-Ochoa et al., 2000).

Структура и конформација молекула ксантана објашњавају уједначеност његових хемијских и физичких карактеристика. Овај макромолекул је отпоран на промене температуре, вредности рН, јонске јачине раствора и не подлеже топлотној, киселинској и алкалној хидролизи. Бочни низови макромолекула представљају "штит" за основни низ па је овај биополимер у великој мери отпоран и на ензимску хидролизу (Sharma et al., 2006).

Прах ксантана се лако раствара у топлој и хладној води, као и у различитим органским и неорганским растварачима. При томе, уз механичко мешање, настају опалесцентни раствори који показују високе вредности вискозитета већ при малим концентрацијама биополимера (од 600-2000 ppm) (Додић и Граховац, 2013)

Вискозитет раствора ксантана зависи од више фактора од којих су најзначајнији концентрација биополимера, садржај пирувата у молекулу и расподела молекулских маса. Раствори ксантана су нењутновски флуиди и показују псеудопластичан тип протицања. Вискозитет водених раствора овог полисахарида се не мења значајно са променом температуре (0-100°C), вредности рН (1,5-13,0) и јонске јачине раствора (садржај NaCl већи од 150 g/l) (Sharma et al., 2006).

Када садржај алкохола малих молекулских маса у воденом раствору ксантана пређе 50% (v/v) уз садржај једновалентних електролита већи од 1% (v/v), долази до преципитације макромолекула (Додић и Граховац, 2013).

У воденим растворима ксантана могућ је микробиолошки раст. Такође, подложен је деполимеризацији ензимима синтетисаним од стране одређених микроорганизама, а деградирају га и јака оксидациона средства, као што су пероксиди и сулфати (Sharma et al., 2006).

Ксантан ступа у интеракцију са галактомананима (гуар гума, тара гума, гума семена рогача), док са глукомананима испољава синергистичко деловање што доводи до побољшања вискозитета и формирања гела (Waites et al., 2001). Доказана је и безбедна примена ксантана у токсиколошком и алерголошком погледу. Поред тога, овај биополимер је биообновљив и биодеградабилан што је његов додатни квалитет из угла заштите животне средине (Sharma et al., 2006).

Захваљујући својим специфичним карактеристикама ксантан је нашао примену као угушћивач, стабилизатор суспензија, емулгатор, регулатор протока флуида, инхибитор кристализације и сурфактант у прехранбеној, нафтној, козметичкој и фармацеутској индустрији, као и у агрохемији (Palaniraj and Jayaraman, 2011). Ксантан који се примењује у прехранбеној индустрији одобрила је Европска Унија, а 1980. године додељена му је ознака E415 (Sharma et al., 2006). Процењено је да је у последњој деценији двадесетог века од укупне количине произведеног ксантана 65% употребљено у индустрији хране, 15% процената у нафтној индустрији, а 20% у остале сврхе (Додић и Граховац, 2013).

### 3.3.2. Бактерије рода *Xanthomonas*

Први корак у производњи микробиолошких полисахарида представља одабир одговарајућег производног соја. До сада је откривен велики број микроорганизама који имају способност биосинтезе полисахарида. Међу њима се посебно истичу бактерије рода *Xanthomonas* јер продукују ксантан, који је од свих микробиолошких полисахарида, комерцијално гледано, најзначајнији. Сви припадници поменутог рода су фитопатогени. Изазивају инфекције великог броја биљака укључујући и оне које су значајне за пољопривреду, као што су купус, луцерка и пасуљ. Иако је доказано да сојеви бактерија *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas malvacearum*, *Xanthomonas phaseoli* и *Xanthomonas axonopodis* имају изражене производне карактеристике, и даље је најшире примењивани микроорганизам за биотехнолошку производњу ксантана у индустријским размерама референтни сој *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 (NRRL B-1459). (Leela and Sharma, 2000; Anbuselvi et al., 2012).

Таксономски *Xanthomonas campestris* су бактерије из рода *Xanthomonas*, који припада породици *Xanthomonadaceae*, реду *Xanthomonadales*, класи *Gamma Proteobacteria*, разделу *Proteobacteria* у царству *Bacteria*.

Колоније *Xanthomonas campestris* на површини агара су глатке, округле и бутерне конзистенције, а на подлози са глукозом слузасте, испупчене и сјајне. На температури од 28°C, потребно је од 2-3 дана до 7-10 дана да се створи колонија пречника око 1 mm. Када су видљиве голим оком, колоније су транспарентне и меке, бледо жуте боје, а њихов број временом варира у зависности од соја и употребљене подлоге. Жута боја колонија потиче од пигмента ксантомонадина (Додић и Граховац, 2013).

*Xanthomonas campestris* су грам-негативне, аспорогене штапићасте бактерије, ширине 0,4-0,7  $\mu\text{m}$  и 0,7-1,8  $\mu\text{m}$  дужине, углавном појединачне, покретне, са једном поларном флагелом (монотрихе) дужине 1,7-3,0  $\mu\text{m}$ , мирујући стадијум није познат (García-Ochoa et al., 2000).

Бактерије из рода *Xanthomonas* су хемоорганотрофи. Каталаза позитивни, оксидаза негативни или слабо позитивни. Нитрате не редукују.  $H_2S$  позитивни, а индол негативни. Киселину без гаса производе из арабинозе, ксилозе, глукозе, галактозе, манозе, лактозе, малтозе, сахарозе, декстрина, рафинозе, глицерола и манитола, али не и из скроба, ескулина, дулцита (галактитол), рамнозе, инулина, итд. Већина брзо хидролизује скроб и Tween 80. Минималне потребе за раст су комплексне и обично захтевају метионин, глутаминску и никотинску киселину. Аспарагин им може бити извор азота у подлози са глукозом (као извором угљеника), али не може бити истовремено извор угљеника и азота (Додић и Граховац, 2013).

*Xanthomonas campestris* су облигатни аероби. Раст испољавају на температури од 7-39°C, а оптимум им је од 25-30°C. Толеранција на NaCl је 1% (García-Ochoa et al., 2000).

Различити ксантаногени сојеви под истим условима продукују неједнаке количине биополимера веома различите структуре, а самим тим и квалитета што, уз економске и практичне разлоге, знатно смањује број сојева интересантних за индустријску производњу. Стога су напори научне јавности у великој мери усмерени ка изоловању сојева из природног окружења који би имали изражене производне карактеристике. Такође, одабрани сојеви се могу додатно унапредити применом техника генетичког инжењерства. Циљеви генетичке модификације, у овом случају, су изазивање промена којим би се побољшао квалитет и повећао квантитет, али и комерцијална вредност финалног производа, а ту су и прилагођавање јефтинијим супстратима, повећање приноса, скраћење процеса производње, као и олакшавање издвајања и пречишћавања. Ови сојеви представљају огроман потенцијал, али је пут од изолације до комерцијалне употребе соја као производног дуг и мукотрпан (Rosalam and England, 2006).

### 3.3.3. Хранљиве подлоге и култивациони медијуми за производњу ксантана

Састав хранљивих подлога и култивационих медијума је од посебног значаја за биотехнолошку производњу ксантана. У зависности од фазе производног процеса користе се медијуми различитог састава јер метаболизам производног микроорганизма поставља различите захтеве у погледу нутријената у зависности од тога која је фаза процеса производње ксантана у току. Стога разликујемо подлоге за припрему инокулума и медијуме за биосинтезу (Додић и Граховац, 2013). Иако је основни принцип њихове формулације задовољавање захтева производних микроорганизама, за конкретан производни сој, компоненте које представљају изворе угљеника, азота, фосфора и других материја, али и њихове количине бирају се тако да су у економском и еколошком погледу најоправданије.

Хранљиве подлоге које се користе за припрему инокулума, односно за освежавање и умножавање производне културе су тако дефинисаног састава да се постиже брз раст и умножавање производног микроорганизма. Дакле, ћелијама морају бити доступни нутријенти потребни за синтезу мембрана, протеина, ћелијских зидова, хромозома и осталих компоненти (Rosalam and England, 2006). Због тога су подлоге које се користе за припрему инокулума, у односу на производне медијуме, богатије у погледу садржаја свих компонената неопходних за раст и умножавање ћелија.

Подлоге за припрему инокулума у производњи ксантана 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 (Додић и Граховац, 2013).

С обзиром да је ксантан секундарни метаболит бактерија *Xanthomonas campestris* за његову производњу користе се медијуми којима се фаворизује биосинтеза уз ограничен раст биомасе. Да би дошло до продукције овог биополимера хранљива подлога мора да садржи макронутријенте, од којих су најзначајнији угљеник, азот и фосфор, али и бројне микронутријенте, као што су калијум, магнезијум и калцијум (García-Ochoa et al., 2000). Такође, у овој фази производње тежи се коришћењу полусинтетичких или природних медијума за чију се припрему користе јефтине сировине, док се синтетичке подлоге најчешће користе током умножавања производне културе у лабораторијским условима (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Резултати великог броја истраживања указују на то да концентрација и одабир извора угљеника у великој мери утичу на принос и квалитет синтетисаног биополимера. У условима индустријске производње, ксантан се најчешће добија на полусинтетичким подлогама које као извор угљеника садрже глукозу или сахарозу (García-Ochoa et al., 2000). Такође, доста добар принос и квалитет производа постиже се и са подлогама на бази малтозе, арабинозе и растворљивим скробом. Иницијална концентрација извора угљеника у подлози за биосинтезу варира у зависности од типа супстрата и трајања процеса. Ипак, количина шећера коју подлога садржи не сме да буде већа од 50 g/l (Leela and Sharma, 2000). Максимална продукција ксантана постиже се када је у подлози око 20-40 g/l ферментабилних шећера (García-Ochoa et al., 2000), док се најбољи степен конверзије извора угљеника у ксантан постиже када примењена подлога садржи око 10 g/l усвојивих шећерних компоненти (Souw and Demain, 1979).

У медијумима за производњу ксантана извори азота су лимитирајући нутријенти за умножавање биомасе јер се њиховим исцрпљењем успорава раст ћелија производног микроорганизма, а фаворизује биосинтеза. Стога је за висок принос ксантана и квалитет какав је пожељан за примену у прехранбеној индустрији потребно да однос угљеника и азота у подлози буде што већи (Lo et al., 1997). Поред органских извора, као што су екстракт квасца, хидролизати казеина, пептон и сојино брашно, полусинтетичке подлоге за биосинтезу садрже и амонијумове и нитратне соли као неорганске изворе азота (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Калијум, магнезијум и фосфор, такође, су лимитирајући нутријенти за раст и размножавање ћелија. У синтетичке подлоге за производњу додају се у облику лако растворних соли какве су сулфати и фосфати. Додатак ових соли у полусинтетичке и природне подлоге није обавезан јер их комплексне материје, које су основни извори угљеника и азота, садрже (Додић и Граховац, 2013).

Подлоге за производњу ксантана често садрже и различите органске киселине, соли гвожђа, мангана и друге потребне нутријенте. Како сви 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).

У биотехнолошкој производњи ксантана све више се користе медијуми који у својој основи садрже отпадне токове различитих грана индустрије. Осим што представљају одличан извор свих елемената који су потребни производном микроорганизму за раст и продукцију, ове подлоге су веома јефтине. Употреба супстрата ниске тржишне вредности за биосинтезу високо вредног биополимера какав је ксантан има двоструку корист. Са једне стране то је смањење трошкова производње, а са друге и све већих еколошких проблема изазваним накупљањем ових ефлуената у животној средини. Стога је на лабораторијском нивоу испитивана и доказана могућност биосинтезе ксантана на медијумима који у својој основи садрже кухињски отпад (Li et al., 2016), али и бројне индустријске ефлуенте као што су отпадни токови кондиторске индустрије (Vajić et al., 2014), глицерол из производње биодизела (Brandão et al., 2013; de Jesus Assis et al., 2014; Rončević et al., 2014), отпадна вода од испирања тропа која се генерише током производње пива

(Марков и сар., 2000; Dodić et al., 2011), отпад месне индустрије (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2007) и индустрије маслиновог уља (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996; López et al., 2001), сурутка (Gilani et al., 2011; Savvides et al., 2012), меласа која представља нуспроизвод производње шећера из шећерне репе (Kalogiannis et al., 2003; Gilani et al., 2011b; Gomashé et al., 2013) и шећерне трске (Faria et al., 2011; Murugesan et al., 2012), као и бројни други.

С обзиром да је потврђена могућност биосинтезе ксантана на некавалитетном соку од грожђа (Ghashghaei et al., 2016), који је по свом саставу сличан отпадним водама винарија, интересантно би било испитати и успешност њихове примене у наведеном биопроцесу. Ова замисао поткрепљена је и чињеницом да бактерије рода *Xanthomonas* поседују способност метаболисања полифенолних компоненти, који се у отпадним токовима из производње вина налазе у значајним количинама, при чему их користе као изворе угљеника (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996). Осим тога, течне ефлуенте индустрије вина карактерише висок садржај различитих органских киселина за које је потврђено да имају стимулаторни ефекат на биосинтезу ксантана (Shehni et al., 2011).

### 3.3.4. Процесни услови

Метаболичка активност селекционисаног производног соја на медијуму оптималне формулације у значајној мери зависи и од услова средине какви су вредност рН, садржај раствореног, али и температура. Стабилан биопроцес са предвидивим исходом одвија се уз одговарајућу хомогенизацију култивационог медијума у стерилним условима. И на лабораторијском нивоу процесни услови морају бити прецизно дефинисани и контролисани, а у индустријским размерама одржавање њихове вредности у оптималним границама је основа успешности биотехнолошке производње ксантана (Додић и Граховац, 2013).

Процесни услови, директно или индиректно, утичу на количину биосинтетисаног ксантана и његову хемисјку структуру, а самим тим и на квалитет. Стога се вредности процесних параметара подешавају у складу са крајњим циљем производног поступка, било да је то постизање високог приноса или синтеза биополимера одређене хемијске структуре. Оптимизација параметра процеса нарочито је значајна ако се испитује производња ксантана применом нових производних сојева. Такође, оптимална вредност једног процесног параметра за одређени микроорганизам се мења са променом састава медијума и вредности других процесних параметара који су значајни за биосинтезу ксантана (García-Ochoa et al., 2000).

#### 3.3.4.1. Вредност рН

Вредност рН култивационог медијума је један од критичних параметара за успешно извођење биотехнолошког поступка производње ксантана. Оптималне вредности рН за умножавање биомасе и ензима који катализују метаболички пут којим настаје жељени биополимер су веома сличне. Идеална вредност рН за раст и размножавање бактерија рода *Xanthomonas* је између 6,0 и 7,5, док је биосинтеза ксантана најинтензивнија ако је вредност овог процесног параметра у опсегу од 7,0 до 8,0. Стога се иницијална вредност рН медијума за производњу овог биополимера подешава на 7,0 (Sherley and Priyadharshini, 2015).

Услед продукције органских киселина и ксантана, који садржи киселе функционалне групе, вредност рН култивационе течности опада током трајања биопроцеса (Anbuselvi et al., 2012). Критична вредност рН за биосинтезу ксантана је 5,0. Због тога се у току биопроцеса, уколико медијум није адекватно пуферисан, вредност овог процесног параметра коригује стерилним

раствором базе, и то најчешће калијум-хидроксидом, натријум-хидроксидом или амонијум-хидроксидом (García-Ochoa et al., 2000). Према великом броју аутора успешност биопроцеса је загарантована ако се вредност рН током читавог трајања култивације одржава у опсегу од 6,0 до 8,0 (Mirik et al., 2011).

Током неколико различитих истраживања потврђено је да регулација наведеног параметра процеса не утиче на квалитет биосинтетисаног ксантана, али свакако да од вредности рН култивационог медијума зависи интензитет метаболичке активности производног микро-организма, а самим тим и принос жељеног биополимера (García-Ochoa et al., 2000; Mirik et al., 2011; Sherley and Priyadharshini, 2015).

### 3.3.4.2. Садржај раствореног кисеоника

Растворени кисеоник је једна од најнеопходнијих компоненти култивационог медијума за извођење биосинтезе ксантана. Како су бактерије рода *Xanthomonas* стриктни аероби потребе за овим нутријентом су велике. Током извођења биопроцеса садржај раствореног кисеоника се смањује као последица његове потрошње за синтезу ћелијских конституената, односно умножавање биомасе и обезбеђивање енергије, као и због драстичног повећања вискозитета култивационе течности. Међутим, ако количина доступног кисеоника опадне испод критичне вредности долази до инхибиције метаболичке активности производног соја што води ка смањењу приноса жељеног производа, а самим тим и успешности биопроцеса. Када је у питању производња ксантана критичан ниво кисеоника је између 6% и 10%, док испод 6% продукција ксантана и специфична брзина усвајања кисеоника од стране производне културе значајно опадају (Amanullah et al., 1998; Додић и Граховац, 2013).

На растворљивост кисеоника утиче више фактора, а у поређењу са другим компонентама медијума неупоредиво је мања. За најбољу илустрацију таквог односа растворљивост кисеоника упоређена је са растворљивошћу глукозе, која је начешће коришћени извор угљеника у медијумима за производњу ксантана. Утврђено је да је растворљивост кисеоника је око 6000 пута мања од растворљивости поменутог шећера док су брзине њихове потрошње истог реда величине. С обзиром да је брзина трошења раствореног кисеоника од стране производне културе већа од брзине његове апсорпције из ваздуха у медијум (Барас и сар., 2009), јасно да је брзина растварања кисеоника ограничавајући фактор за успешно извођење производње ксантана.

Осим на количину, растворљивост кисеоника одражава се и на квалитет синтетисаног биополимера јер је садржај пирувата који се уграђује у макромолекул ксантана у директној вези управо са доступном количином овог нутријента, Поред тога, са повећањем степена засићења медијума кисеоником дистрибуција молекулске масе се проширује ка већим вредностима што, заједно уз повећање садржаја биополимера, мења реолошке параметре култивационе течности (Додић и Граховац, 2013).

Један од највећих проблема индустријске производње ксантана је већ поменути пораст вискозитета медијума који у огромној мери утиче на доступност кисеоника и нутријената. Стога су добар пренос масе кисеоника и одсуство зона застоја у биореактору од изузетног значаја за високу продуктивност примењеног производног соја и велику молекулску масу биосинтетисаног ксантана. Како би се то и остварило биотехнолошки поступак добијања овог вредног биопроизвода захтева интензивну аерацију и адекватно мешање култивационог медијума (Becker et al., 1998).



Услед повећања интензитета аерације и брзине мешања, а у зависности од састава медијума, може доћи до формирања густе пене на површини култивационе течности. Пенушање подлоге у току биосинтезе ксантана је непожељно јер има негативан утицај на пренос масе кисеоника, а присуство пене у зони око мешалице може умањити ефикасност мешања. Како би се формирање пене минимизовало додају се антипенушавци. Имајући у виду да додаток средстава за сузбијање пене смањује брзину преноса масе кисеоника и до 50%, ове компоненте се додају по потреби током извођења производног поступка и то у најмањој могућој мери (Hsu, 2003).

## Аерација

Оптималан садржај раствореног кисеоника може се обезбедити интензивирањем аерације, односно повећањем протока ваздуха кроз култивациону течност. Утврђено је да извођење биопроцеса у два пута интензивнијим условима аерације резултира три пута бржој биосинтези ксантана (Kongruang, 2006).

Генерално, са повећањем протока ваздуха, независно од типа биореактора у којем се биопроцес изводи, повећава се и вредност запреминског коефицијента преноса масе кисеоника који је директно одговоран за његову расторљивост. Међутим, у биореакторима са механичким мешањем интензитет аерације у значајно мањој мери утиче на пренос масе кисеоника него брзина мешања, чак и ако се проток ваздуха повећа до вредности која изазива плављење мешалице. Са друге стране, сувише велико повећање протока ваздуха доводи до формирања једног већег мехура који се пење до површине култивационе течности када је напушта (Hsu, 2003).

Приликом производње ксантана у лабораторијским биореакторима са механичким мешањем обично се проток ваздуха одржава константним и то најчешће у опсегу 0,5 l/l/min до 3,0 l/l/min (Borges et al., 2008; Moshaf et al., 2014), док препоручен интензитет аерације у биореакторима индустријских размера у великој мери зависи од брзине мешања. Уколико је хомогенизација медијума адекватна, проток ваздуха од минимум 0,3 l/l/min је одговарајући за успешно извођење производног поступка (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

## Мешање

Утицај брзине мешања на биосинтезу ксантана уско је повезан са количином расположивог кисеоника, а самим тим и са аерацијом. Интензитет аерације и брзина мешања морају бити тако подешени да се остварује што боља размена кисеоника између медијума и ваздуха који се диспергује (García-Ochoa et al., 2000). Међутим, мешање има много значајнији утицај на пренос масе кисеоника у веома вискозним системима, какве су ксантанове култивационе течности, у односу на аерацију (Borges et al., 2008) јер се мешањем продужава задржавање мехурића ваздуха у култивационој течности, смањује њихова величина како би се повећала специфична међуфазна површина, али и смањује дебљина граничне површине гас-течност (Waites et al., 2001).

Интензитет мешања је ограничен енергетском ефикасношћу примењене операције, пењењем услед мешања, али и аерације, „повећањем“ запремине ферментационе течности и негативним деловањем смицајних сила на производни микроорганизам. С обзиром на специфичности, за успешно извођење биосинтезе ксантана неопходно је изабрати мешач погодне геометрије, као и оптимизовати брзину мешања и трајање ове операције у конкретним условима производње (Додић и Граховац, 2013).

Приликом производње ксантана у класичним биореакторима са механичким мешањем обично се интензитет аерације одржава на око 1 l/min, док мешање може бити константно или се варира током биопроцеса. Уколико се биосинтеза изводи при непромењеној брзини мешања продуктивност производног соја је смањена што је последица ограниченог преноса масе кисеоника, до којег долази ако је брзина обртања мешалице мања од 500 o/min, или механичких ошећења ћелија у условима интензивног мешања, изнад 500 o/min (Casas et al., 2000). Стога се брзина мешања обично варира у току биопроцеса, и то од око 200 o/min у првим фазама култивације (García-Ochoa et al., 2000) након чега се повећава на жељену вредност која зависи од крајњег циља производног поступка, а углавном се налази у опсегу од 400 o/min до 800 o/min (Peters et al., 1989; Psomas et al., 2007; Mirik et al., 2011). Такође, висока ефикасност биопроцеса може се постићи и ако се интензитет хомогенизације медијума мења у складу са тренутном концентрацијом раствореног кисеоника у култивационој течности. У том случају препоручује се повремено кориговање брзине мешања тако да садржај раствореног кисеоника у култивационој течности у свим фазама биопроцеса буде између 10% и 30% (Casas et al., 2000; Nery et al., 2013).

Током вишегодишњих испитивања утицаја мешања на показатеље успешности биосинтезе ксантана утврђено је да се са интензивирањем хомогенизације култивационог медијума подстиче продукција биополимера већих молекулских маса (Peters et al., 1989; Zeng-sheng et al., 2009).

Квалитет хомогенизације медијума, а самим тим и пренос масе кисеоника у великој мери зависе и од одабира типа мешалице, али и од односа пречника импелера и суда биореактора. У циљу побољшања укупног ефекта мешања веома вискозних ксантанових култивационих течности препоручује употреба две паралелне Руштонове турбине постављене на тачно одређеном растојању (Nakajima et al., 1990). Такође, још већа успешност биопроцеса се може остварити ако се користе мешалице већег пречника тако да однос пречника импелера и суда минимално износи 0,42 (Amanullah et al., 1998).

Побољшан пренос масе кисеоника и одговарајућа хомогенизација подлоге нису једини бенефити мешања у биотехнолошкој производњи ксантана. Наиме, услед извођења биосинтезе при неадекватним условима мешања може доћи до формирања слузавог полисахаридног слоја на површини ћелија производног соја чиме се смањује дифузија свих нутријената у ћелију, укључујући и кисеоник. Међутим како је овај полисахаридни слој осетљив на силе смицања изазване мешањем, извођењем биопроцеса при довољно великој брзини мешања долази до његовог уклањања са површине ћелија при чему се смањују дифузиона ограничења (Hsu, 2003).

### 3.3.4.3. Температура

Температура је процесни параметар који се неизоставно прати и одржава у границама оптималним за постизање високе ефикасности биопроцеса јер директно утиче на метаболичку активност производног соја (Додић и Граховац, 2013). Утицај температуре на биосинтезу ксантана детаљно је испитиван током вишегодишњих истраживања када је утврђено да температурни оптимуми за умножавање биомасе и продукцију биополимера нису исти. У фази интензивног раста и размножавања ћелија оптимална температура је од 25°C до 27°C, док се максимална биосинтеза ксантана постиже на температури од 30°C до 35°C (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Осим на принос, процесна температура у великој мери утиче и на квалитет синтетисаног биополимера. Дакле, са повећањем температуре повећава се и количина продукованог ксантана, док хемијска структура и молекулска маса синтетисаног биополимера веома варирају. Ако се биопроцес изводи на температури од 25°C до 28°C садржај ацетатних и пируватних група у макро-

молекулу ксантана ће бити далеко већи него ако би се током извођења производног поступка вредност овог параметра одржавала у опсегу од 31°C до 34°C. С обзиром да је молекулска маса ксантана у директној вези са његовом хемијском структуром, јасно је да се биополимер већих молекулских маса синтетише при нижим температурама. Све наведено указује да се при високим вредностима процесне температуре (31-34°C) фаворизује биосинтеза ксантана мањих молекулских маса са ниским садржајем ацетата и пирувата. Иако се у наведеном температурном опсегу постижу високи приноси производа, водени раствори синтетисаног биополимера показују ниске вредности вискозитета што је директна последица његове хемијске структуре (Casas et al., 2000).

Значај температуре у биотехнолошкој производњи ксантана се може посматрати и са становишта утицаја овог процесног параметра на растворљивост кисеоника. Иако се са повећањем процесне температуре значајно интензивира биосинтеза ксантана садржај раствореног кисеоника опада (Waites et al., 2001; Atiya, 2012).

#### 3.3.4.4. Стерилност

Успешност биосинтезе ксантана у лабораторијским и индустријским условима веома зависи од стерилности. Да би се биопроцес одвијао под стерилним условима неопходно је да су хранљива подлога, ваздух за аерацију, биореактор са свим припадајућим деловима и системима и све компоненте које се током биопроцеса додају у биореактор, ослобођени вегетативних облика микроорганизама контаминаната и/или њихових спора чиме им је онемогућена репродукција. Елиминација потенцијално присутних контаминаната постиже се њиховим издвајањем или инактивацијом, при чему се примењују различити поступци. Успешно спроведен поступак стерилизације гарантује да је потенцијално присуство контаминаната могуће у једном од милион узорака производа или у једном од хиљаду насумичних узорака из било ког дела самог биопроцеса. Стерилност биопроцеса подразумева и да се инокулација изврши чистом културом производног микроорганизама под стерилним условима и да се остварени стерилни услови одржавају током његовог трајања (Додић и Граховац, 2013). Управо строги захтеви за стерилним радом су један од главних разлога због чега се биотехнолошка производња ксантана углавном изводи дисконтинуално, односно због чега није дошло до развоја континуалног индустријског поступка (Waites et al., 2001).

#### 3.3.5. Биореактори за производњу ксантана

Иако је на лабораторијском нивоу доказана могућност извођења производње ксантана у различитим биореакторима, у индустријској пракси најчешће се за синтезу овог биополимера користе биореактори са механичким мешањем и принудном аерацијом. У овим биореакторима аеробни услови обезбеђени су континуалним протоком ваздуха и адекватним мешањем, док се вредности осталих процесних параметара лако мере и регулишу (García-Ochoa et al., 2000). Због тога је класичан биореактор са механичким мешањем опремљен сензорима за мерење температуре, вредности рН и концентрације раствореног кисеоника, као и системом за контролу брзине мешања (Allman, 2012). Поред основне инструментације, могу бити уграђени и сензори за мерење нивоа пене, садржаја биомасе, супстрата и производа (Pérez-Correa and Agosin, 2002). Важно је подсетити се да суд биореактора није херметички затворен систем већ се састоји од различитих делова, и то поклопца, ротирајућих заптивача, механичког разбијача пене, нивоказног стакла, као и отвора за узорковање, додаток инокулума, увођење и извођење медијума. Спојеве свих ових делова на улазу и излазу суда морају да буду максимално заптивени јер се само у том случају може одржати неопходна стерилност биорпоцеса (Додић и Попов, 2011).

Ипак, опште је прихваћен став да су биореактори са механичким мешањем нужни да би се постигао добар пренос масе и топлоте у веома вискозним системима. Мада се интензивирањем аерације и хомогенизације медијума, као и применом различитих комбинација мешалица и ефикаснијих диспергатора ваздуха побољшала ефикасност биопроцеса и смањила енергетска потрошња, са појавом стагнатних зона у бореактору, али и уочавањем ограниченог преноса масе кисеоника разматрају се карактеристике других биореактора, конкретно барботажне колоне, *air-lift* биореактора, биореактора са рецикулацијом култивационе течности помоћу пумпе, емулзионих система вода у уљу и биореактора са имобилисаним ћелијама. И поред успешне лабораторијске примене, заједнички недостатак за све њих је отежана конструкција биореактора увећаних размера. Поред тога, иако емулзиони системи типа вода у уљу имају велику контактну површину која обезбеђује добар пренос масе кисеоника и при високим концентрацијама ксантана, проблеми узроковани додатком емулгатора и потешкоће које се приликом издвајања производа јављају још увек нису превазиђени. Са друге стране, биореактор са имобилисаним ћелијама бактерија рода *Xanthomonas* могао би се користити за дуготрајнију континуалну производњу ксантана, уколико би ограничен пренос масе кисеоника услед присуства носача могао бити сведен на меру у којој неће ометати успешну реализацију биопроцеса (Hsu, 2003).

### 3.3.6. Производни поступак

Поред производног соја, састава медијума, вредности процесних параметара и типа биореактора, на ефикасност биосинтезе ксантана веома утиче и режим производње, а који може бити дисконтинуални или континуални (Palaniraj and Jayaraman, 2011). Предности производње ксантана дисконтинуалним поступком су смањен ризик од контаминације и лакша контрола параметара. Међутим, проблеми који се јављају код овог начина производње су промене услова, као што су снижавање вредности рН, исцрпљење нутријената, стварање токсичних једињења, које уз утежан пренос масе кисеоника могу негативно утицати на метаболизам ћелија производног микроорганизама (Rosalam and England, 2006). Ипак, у овом раду пажња је посвећена дисконтинуалној производњи ксантана која је због лакше контроле процеса и сигурног квалитета производа и даље доминантан режим производње.

Производња ксантана започиње освежавањем и умножавањем физиолошки активних ћелија *Xanthomonas campestris* у поступку припреме инокулума. Освежавање производног микроорганизама из збирке култура врши се на полуврстој хранљивој подлози. Поступак је аеробан, стационаран, одвија се на температури од 24°C до 26°C и траје до 24 h. 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 суспедовањем културе са полуврсте подлоге за освежавање за коју се сматра да је довољно активна, у течну подлогу за умножавање. Инкубација се одвија на температури од 25°C уз обавезно мешање у трајању од око 24 h (Додић и Граховац, 2013).

Припрема инокулума најчешће се одвија у више фаза. Оно што је заједничко за све етапе су слични услови инкубације (температура и обавезно мешање које се врши на различите начине), као и неједнако замућење бујона. У таквим инокулумима, уобичајеним методима какав је нефелометријски, немогуће је одредити удео ксантана и удео биомасе ћелија. Из тог разлога, а са циљем добијања инокулума приближног квалитета, прибегава се вишеструком пасажирању јер се на тај начин производна култура доводи у стање максималне физиолошке активности (Додић и Граховац, 2013). У подлоге за биосинтезу инокулум припремљен по описаном поступку се додаје у количини од 5-10 % рачунато на укупну запремину подлоге (Leela and Sharma, 2000).

Процес биосинтезе ксантана у биореактору одвија се у две фазе. У првој фази долази првенствено до продукције биомасе, тј. интензивног раста и умножавања ћелија производног микроорганизма уз минималну продукцију ксантана. У другој фази број ћелија практично се не мења и у њој се синтетише највећи део биополимера. При крају биопроцеса долази до опадања садржаја биомасе услед лизе ћелија (Додић и Граховац, 2013). У индустријским условима биосинтеза ксантана се одвија дисконтинуално у трајању од око 100 h (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Производња ксантана је један од биопроцеса у коме се одигравају најдрастичније промене реологије култивационе течности које су последица лучења биополимера током процеса. Стога се овај биотехнолошки процес прати на основу вискозитета узорака култивационог медијума, узетих у одређеним временским интервалима (Salamone, 1996).

По завршетку биопроцеса у култивационој течности налази се око 10-30 g/l ксантана, око 1-10 g/l ћелија производног микроорганизма и око 3-10 g/l неискоришћених нутријената. Издвајање ксантана из таквог медијума је компликовано и скупо. Од укупних трошкова производње овог биополимера, око 50 % чине трошкови издвајања и пречишћавања. Примењене технике издвајања и степен чистоће ксантана зависе од његове крајње намене. Из ксантана који ће се користити у петрохемијској индустрији морају бити уклоњене све честице, као и ћелије производног микроорганизма. Ксантан намењен за примену у прехранбеној индустрији мора бити очишћен од биомасе и реагенаса коришћених за издвајање и пречишћавање. Захтеви за чистоћу ксантана који ће примењивати у текстилној индустрији најмање су строги (García-Ochoa et al., 2000).

С обзиром да су сви сојеви бактерија рода *Xanthomonas* фитопатогени веома је важно да не дође до неконтролисаног ширења ових микроорганизма у околни простор. Стога се по завршетку биосинтезе, а пре издвајања ксантана, врши уклањање или инактивација ћелија производног микроорганизма. У зависности од намене произведеног биополимера, у ове сврхе могу да се користе различити поступци као што су термички третман, третман биоцидима или стерилна филтрација (Додић и Граховац, 2013).

Издавање ксантана почиње центрифугирањем или филтрацијом које за циљ имају уклањање ћелија производног микроорганизма. У неким случајевима велика концентрација ксантана култивационој течности чини веома вискозном због чега издвајање биомасе може бити отежано. Овај проблем решава се растварањем култивационе течности што додатно поскупљује производни процес (Waites et al., 2001).

Након одвајања биомасе, најчешће се ксантан из ферментационе течности издваја таложењем. Издавање таложењем је могуће захваљујући поливалентном карактеру биополимера. Ово се изводи 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 додаток електролита, а овако издвојен биополимер намењен је прехранбеној индустрији. Ксантан се таложи при садржају етанола од око 55 % (v/v) и садржају zasiћеног раствора калијум-хлорида од 1 % (v/v) 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 (Додић и Граховац, 2013).

Издвојени ксантан се раствара у смеси алкохол-вода, центрифугира или филтрира са циљем уклањања ћелија, остатака подлоге и пигмената, а затим се поново таложи. Након тога, биополимер се суши на ротационим сушницама или сушницама са распршивањем. Уситња-

вање млиновима до честица одговарајуће величине је финални корак пред паковање у водо-непропусну амбалажу, а врши се ради бољег растварања и лакше употребе коначног производа. Поред тога, додају се и антибактеријска средства са циљем очувања стабилности (Becker et al., 1998). На тржиште се пласира у облици праха, пасте или суспензије (Додић и Граховац, 2013). Важно је напоменути да се сви кораци током издвајања и пречишћавања ксантана морају извршити тако да не дође до деградације његове структуре (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

### 3.3.7. Стратегије за развој производње ксантана у увећаним размерама

Под повећањем размера биореактора (*scale-up*) подразумева се повећање величине биореактора од лабораторијског, преко полуиндустријског, до индустријског нивоа. Пројектовање биореактора је један од најзначајнијих проблема приликом развоја биопроцеса увећаних размера. Логично је поставити питање: зашто се не направи индустријски биореактор, геометријски сличан лабораторијском, с једнаком специфичном снагом мешања или специфичним протоком ваздуха? Одговор на ово питање лежи у чињеници да сви проблеми везани за повећање размера биореактора произилазе управо из зависности процесних параметара од његове величине (Барас и сар., 2009).

Пројектовање биореактора и развој биопроцеса у увећаним размерама играју велику улогу у индустријализацији жељеног производног поступка. Економичност и ефикасност су главни иницијатори за увећање размера биотехнолошких процеса јер се са повећањем про-изводних капацитета оперативни трошкови смањују са експонентом од 0,3-0,5 (Hsu, 2003).

Како би се извођењем биопроцеса у великим запреминама добили исти или бар веома слични резултати који су се у малим показали као најпогоднији потребно је (Hsu, 2003):

- извршити основну оптимизацију биопроцеса на лабораторијском нивоу,
- потврдити добијене резултате извођењем биопроцеса под оптималним условима користећи пилот постројење и
- извршити процену економске исплативости извођења предложеног биопроцеса на индустријском нивоу.

Када је у питању увећање размера предложеног производног поступка за добијање ксантана треба имати у виду да је постизање високог приноса биополимера чији су раствори жељеног вискозитета отежано услед неадекватног преноса масе кисеоника који је са повећањем размера биопроцеса озбиљнији и компликованији. С обзиром да се током биосинтезе ксантана дешавају драстичне промене реологије култивационе течности, која од нењутновске на почетку постаје изразито псеудопластична на крају, заједно уз неадекватно мешање и отежану растворљивост кисеоника, увећање размера производње овог биополимера представља велики изазов. Међутим, јасно је да су интензитет аерације и брзина мешања медијума најзначајнији параметри који се разматрају приликом дефинисања стратегија за развој индустријске производње ксантана. Од пресудног је значаја да се приликом пројектовања биореактора великих запремина задржи однос пречника мешалице и суда, брзина мешања и интензитет аерације који су у лабораторијском биореактору дефинисани, а у пилот постројењу потврђени као оптимални за постизање жељене ефикасности предложеног биопроцеса (Hsu, 2003).

### 3.4. Моделовање и оптимизација биотехнолошких процеса

Класичан приступ експерименталном раду подразумева испитивање утицаја појединачних фактора на неку појаву или процес (*one-factor-at-a-time technique*). Иако ова техника захтева доста напора и времена, највећи недостатак њене примене је што не обухвата интеракције фактора те стога не приказује укупан утицај фактора на процес. Међутим, данас се наведени недостаци могу моделовањем и оптимизацијом биопроцеса (Baş and Boyacı, 2007).

Иако су одавно су чињени покушаји да се биопроцеси опишу математички тек недавно су, захваљујући скупљеним неопходним знањима о биохемијским реакцијама у живој ћелији, мерним инстру-ментима и биореакторима, као и развијеном математичком апарату, рачунарској опреми и софтверским пакетима, учињени напори довели до успешног моделовања биотехнолошких процеса. Очекује се да ће с даљим развојем биохемијско-инжењерских научних дисциплина значај математичких модела још више порасти (Барас и сар., 2009).

Математички модели су математички описи биопроцеса који, иако су често на упрошћеном нивоу, довољно адекватно представљају њихову природу. Обично су то групе математичких једначина које описују битне промене у току биопроцеса. Математички модели се дефинишу из више разлога од којих су најважнији следећи (Барас и сар., 2009):

- предвиђање конверзије супстрата или производности биопроцеса,
- испитивање рада постројења у различитим условима,
- пројектовање биопроцеса,
- увећање размера биопроцеса,
- модификација у циљу унапређења биопроцеса,
- оптимизација биопроцеса,
- компјутерско симулирање биопроцеса,
- идентификовање непознатих утицајних фактора и
- контрола биопроцеса.

Оптимизација биопроцеса значи да се биотехнолошки процес изводи у условима при којима се остварује највећа ефикасност биопроцеса. У индустријској производњи оптимално вођење процеса подразумева остваривање највеће економичности. Често се дефинисање оптималних услова везује за постизање максималног приноса производа жељеног квалитета у што јефтинијим условима производње, с обзиром да ови фактори најдиректније одређују профитабилност индустријског биопроцеса. Дакле, оптимизацију биопроцеса треба схватити као његово унапређење у смислу повећања профитабилности биопроцеса. С обзиром да се знања у области релевантних научних дисциплина свакодневно проширују, оптимизацију треба спроводити стално, али увек смишљено, и то у свим фазама биотехнолошког процеса. Унапређење биопроцеса се може постићи побољшањем (Барас и сар., 2009):

- карактеристика производног микроорганизма,
- састава култивационих медијума и
- процесних услова.

Дефинисање математичких модела и њихове примене у оптимизацији су једне од најзначајнијих техника за повећање ефикасности хемијских и биохемијских процеса. У последње две деценије као најпопуларније технике за моделовање и оптимизацију биотехнолошких процеса користе се поступак одзивне површине и метода жељене функције (Граховац, 2011).

### 3.4.1. Поступак одзивне површине

Поступак одзивне површине (RSM, енгл. Response Surface Methodology) је већ дужи низ година једна од најпопуларнијих метода која се примењује за моделовање биотехнолошких процеса. Може се дефинисати као група математичких и статистичких техника примењених за регресиону анализу података добијених из адекватно планираних експеримената симултаним решавањем система једначина (Allen, 2006). Свака од једначина назива се функција одзива, а њен геометријски приказ се назива одзивна површина, која се може приказати у три димензије или као контурна површина, у две димензије (Brereton, 2003). Дефинисани математички модели успешно могу да опишу утицај појединачних фактора или њихових међусобних комбинација на одабрани биопроцес (Baş and Boyacı, 2007).

Зависност између посматраних одзива (зависно променљиве) и варираних фактора (независно променљиве) може се описати следећом једначином:

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

где је:

- Y – анализирани параметар,
- f – функција одзива,
- $X_1, X_2, X_i$  – испитивани фактори,
- i – број испитиваних фактора и
- $\varepsilon$  – статистичка грешка.

Статистичка грешка представља утицај друге изворе варијабилитета који нису обухваћени дефинисаном функцијом. Најчешће су то грешке начињене приликом експерименталних одређивања. Претпоставља се да стандардна грешка обично има нормалну расподелу са средњом вредношћу између нула и варијансе (Baş and Boyacı, 2007).

Примена поступка одзивне површине за моделовање биотехнолошких процеса подразумева (Baş and Boyacı, 2007):

- одређивање независних променљивих и њихових нивоа,
- одабир експерименталног дизајна и генерисање матрице извођења експеримената и
- дефинисање математичких модела и оцену њихове адекватности.

#### 3.4.1.1. Одређивање независних променљивих и њихових нивоа

Успешност извођења биотехнолошких процеса зависи од више фактора. С обзиром да није могуће истовремено идентификовати утицај свих параметара потребно је селектовати оне који су од пресудног значаја за ефикасност конкретног биопроцеса. Скрининг експерименти су веома корисни за идентификацију независних параметара, а факторијални дизајни се могу користити у ту сврху. Након одабира параметара веома је важно и дефинисати њихове нивое, односно границе у којима ће бити варирани. Одређивање вредности варираних параметара је од пресудног значаја код моделовања биопроцеса јер погрешно изабрани нивои резултују неуспешно изведеним експериментима, а самим тим и немогућности дефинисања адекватних математичких модела (Baş and Boyacı, 2007).



### 3.4.1.2. Одабир експерименталног дизајна

У истраживањима најчешће се користе Бокс-Бенкенов дизајн (BBD, енгл. Box–Behnken design) и централни композитни план (CCD, енгл. Central Composite Design). Они се пре свега разликују по броју експеримената који нам омогућавају адекватно представљање експерименталног простора. Бокс-Бенкенов план има предност над осталима у погледу ефикасности, односно односа између броја коефицијената који се јављају у одабраном моделу и броја експеримената које је потребно извести. Ако се одредимо за квадратни модел одзивне површине, онда је неопходно одредити десет коефицијената у моделу (Ferreira et al., 2007).

Бокс-Бенкенов експериментални дизајн са три фактора на три нивоа и три понављања у централној тачки карактерише извођење 15 експеримената. Ефикасност овог експерименталног плана (0,67) је већа у поређењу са ефикасношћу централног композитног плана (0,58). Друга предност примене Бокс-Бенкеновог дизајна је што не садржи комбинације фактора у којима су сви истовремено на максималном или минималном нивоу. Дакле, извођењем огледа дизајнираних према овом дизајну могу се избећи екстремни експериментални услови за које су могући незадовољавајући резултати. Међутим, поменуте предности Бокс-Бенкеновог плана се губи када се посматра систем са четири и више променљивих, односно испитиваних фактора (Ferreira et al., 2007).

### 3.4.1.3. Дефинисање математичких модела

Дефинисани математички модели, односно одзивне функције су полиномског облика с обзиром да се квалитет фитовања експерименталних података може побољшати повећањем степена полинома. Овакви модели су посебно погодни за решавање оптимizacionих проблема, будући да је њима могуће описати интеракције великог броја фактора, а и процена квалитета фитовања полиномских модела се може лако одредити. Дефинисање значајности појединих фактора могуће је урадити помоћу Студентовог  $t$ -теста, односно  $t$ -вредности повезаних са сваким од коефицијената полинома, које указују који фактори су значајни, односно које од интеракција су битне за посматрани одзив. Најједноставнији полином који се може применити је полином првог реда који у обзир узима само линеарне утицаје појединачних фактора. Ако се као крајњи циљ поступка узме проналажење оптималног решења онда је неопходно користити полиноме другог реда за описивање одабраних одзива. Тада сваки од посматраних фактора мора да има три или пет нивоа вредности у зависности од примењеног експерименталног плана (Јокић, 2010).

### 3.4.1.4. Предности и недостаци примене поступка одзивне површине

У поређењу са класичним експерименталним, односно оптимizacionим методама поступак одзивне површине има неколико предности. На првом месту ова статистичка техника пружа велики број информација за мали број изведених експеримената за разлику од класичних статистичких метода које су подразумевају извођење великог броја експеримената што често одузима много времена и изискује веће трошкове. Друго, применом поступка одзивне површине могуће је утврдити заједнички утицај више фактора на посматрани одзив, а који може бити антагонистички или синергистички. Наведене предности омогућавају успешну примену ове метофологије за решавање оптимizacionих проблема (Baş and Boyacı, 2007).

Са друге стране, највећи недостатак примене поступка одзивне површине јесте немогућност описивања добијених експерименталних података квадратним моделом. У том случају проблем

се може решити варирањем независних параметара у ужем опсегу чиме је могуће повећати адекватност модела. Међутим, треба имати на уму да овакво извођење огледа смањује могућност одређивања стационарне тачке. Због тога је утврђивање опсега у ком ће испитивани фактори да се варирају критична тачка у статистичком планирању експеримената (Baş and Boyacı, 2007).

### 3.4.2. Метода жељене функције

Метода жељене функције (*desirability function*) је један од најчешће примењиваних поступака за оптимизацију биотехнолошких процеса са два или више варираних одзива. Иако је ова метода позната више од двадесет година њена примена је била ограничена услед непостојања софтверских пакета који обједињују дизајн експеримената, регресиону анализу и оптимизацију. Програм Design-Expert обједињује ове кораке у општи нелинеарни алгоритам. Генерални приступ састоји се у конвертовању индивидуалних одзива у индивидуалне жељене функције чије вредности се крећу од 0 до 1. Вредност индивидуалне жељене функције "0" представља најлошију вредност, док вредност "1" представља најбољу вредност посматраног одзива. Укупна жељена функција једнака је геометријској средини појединачних жељених функција (Ferreira et al., 2007).

С обзиром да немају сви одзиви једнак значај у оптимизацији сваком од њих се може доделити приоритет од којег ће зависити и оптималне вредности варираних параметара. Најмање значајном одзиву додељује се вредност приоритета 1, а најзначајнијем 5. Укупна жељена функција имаће вредност 1 само у случају да свака појединачна жељена функција има максималну вредност. Када макар једна појединачна жељена функција има вредност 0 тада ће и укупна жељена функција имати ту вредност што значи да није могуће извести оптимизацију (Costa et al., 2011).

### 3.4.3. Моделовање и оптимизација биотехнолошке производње ксантана

Моделовање и оптимизација биотехнолошке производње ксантана били су предмет истраживања великог броја аутора. Поступак одзивне површине успешно је примењен за дефинисање бројних математичких модела на основу којих је извршена оптимизација садржаја најзначајнијих нутријената како у полусинтетичким подлогама (Moosavi-Nasab et al., 2014; Gahruie et al., 2015) тако и у медијуму који је у својој основи садржао екстракт датуле (Khosravi-Darani et al., 2001). Са друге стране, други аутори су дефинисане математичке моделе применили за оптимизацију процесних параметара, односно интензитета аерације и брзине мешања на медијуму са глицеролом из производње биодизела (de Jesus Assis et al., 2014), температуре, брзине мешања и времена трајања биопроцеса на комерцијалној полусинтетичкој подлози (Psomas et al., 2007), као и вредности рН, температуре и брзине мешања на полусинтетичкој подлози са глукозом (Mirik et al., 2011). Такође, популарна су била и истраживања у којима је истовремено вршена оптимизација састава медијума и вредности процесних параметара (Salah et al., 2010; Moshaf et al., 2011; Moshaf et al., 2014). Међутим, у доступној научној и стручној литератури се не срећу наводи који се односе на истовремену оптимизацију вредности процесних параметара значајних за растворљивост кисеоника.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

---

Експериментална истраживања из оквира ове докторске дисертације реализована су у лабораторијама за Биохемијско инжењерство Технолошког факултета Нови Сад, Универзитета у Новом Саду, које су у потпуности опремљене за извођење и праћење биотехнолошких процеса на лабораторијском нивоу. У овом поглављу наведени су материјали, методе и опрема коришћени за припрему биокатализатора и медијума, за постављање експеримената и праћење параметара биопроцеса, као и за издвајање производа и његову карактеризацију.

## 4.1. Производни микроорганизам

Референтни сој *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 употребљен је као производни микроорганизам за биосинтезу ксантана. Производни сој се дуги низ година чува на агаризованој подлози одговарајућег састава (YMA<sup>®</sup>, HiMedia, India) и температури од 4°C у збирци култура предмета Микробиологија, Технолошког факултета Нови Сад. Током вишедеценијског чувања одржавање активне чисте културе обезбеђено је њеним месечним пресејавањем.

## 4.2. Састав хранљивих подлога и култивационих медијума

За припрему инокулума, односно за освежавање и умножавање производног микроорганизма коришћене су комерцијалне полусинтетичке подлоге YMA<sup>®</sup> (HiMedia, India) и YMB<sup>®</sup> (HiMedia, India), редоследом. Биосинтеза ксантана изведена је на медијумима који су у својој основи садржали течне ефлуенте из различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина. Отпадне воде сакупљене су у неколико винарија са подручја Фрушкогорског виногорја (Сремски рејон, Војводина) током бербе 2014. и 2015. године приликом прања муљаче, пресе и танкова након бистрења шире (флотацијом и таложењем уз додатак пектолитичких ензима), ферментације и првог претакања вина. Пре складиштења на -20°C изведена је груба филтрација прикупљених отпадних токова како би се уклонили остаци бобица грожђа и друге крупне нечистоће.

Припрема медијума за скрининг могућности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија (део 5.1) подразумевала је корекцију вредности рН наведених сировина на 7,0±0,2 без разблаживања и додатног обогаћивања, а затим стерилизацију у аутоклаву на температури од 121°C и притиску од 2,1 bar у трајању од 20 минута.

Испитивање тока биосинтезе ксантана изведено је на отпадним токовима скупљеним за време бербе 2014. године. Припреми медијума који су у својој основи садржали отпадне воде генерисане током прања танкова након бистрења шире, ферментације и претакања вина претходило је центрифугирање наведених ефлуената на 4000 o/min у трајању од 15 минута (Tehtnica LC-321, Železniki, Slovenia) како би се уклониле суспендоване материје. За производњу ксантана на појединачним ефлуентима винарија (део 5.3.1), сировине су, на основу претходно утврђеног састава, разблаживане чесменском водом или обогаћиване еквимоларним количинама глукозе и фруктозе до постизања почетног садржаја шећера од 25 g/l. Медијуми са намешаним отпадним водама (део 5.3.2) садржали су ефлуенте из производње белог односно розе вина, и то од прања пресе, муљаче и танкова након бистрења шире. Отпадна вода од прања танка након бистрења шире флотацијом из производње белог вина разблаживана је отпадним токовима из претходних фаза процеса (од прања муљаче и пресе), а које су додате у једнаким запреминама тако да се постигне садржај шећера од 50 g/l. У течни ефлуент индустрије розе вина скупљен током прања танка након бистрења шире таложењем додате су исте количине отпадних вода од прања муљаче и пресе као и код припреме медијума на бази отпадних вода из производње белог вина, а недостатак извора угљеника надокнађен је глукозом и фруктозом у еквимоларним количинама. У све медијуме додат је калцијум-карбонат у количини од 2 g/l након чега је подешена вредност рН и изведена стерилизација.

Како би се формулисао састав медијума за производњу ксантана чија су основа отпадне воде винарија (део 5.4), ефлуенти скупљени током бербе 2015. године намешани су тако да иницијално садрже 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l и 50 g/l шећера. Супернатанти отпадних вода из производње белог и розе вина генерисаних током прања танкова након бистрења шире флотацијом, добијени

центрифугирањем на 4000 o/min у трајању од 15 минута (Tehtnica LC-321, Železniki, Slovenia), разблаживани су једнаким запреминама отпадних токова од прања муљаче и пресе до постизања жељеног садржаја шећера што је праћено додатком калцијум–карбоната, корекцијом вредности рН и аутоклавирањем. Медијум на којем је остварена највећа ефикасност биопроцеса коришћен је у наставку истраживања.

### 4.3. Припрема инокулума

Производни микроорганизам из збирке култура освежен је на агаризованој подлози одговарајућег састава у аеробним условима, стационарном култивацијом, на температури од 25°C у току 48 h. Освежена култура умножена је у две паралелне серије поступком двоструког пасажирања у количини довољној за инокулацију медијума за биосинтезу. Друга пасажа је засејана са 10% (v/v) инокулума произведеног првим пасажирањем. Инкубација сваке пасаже изведена је у аеробним условима, уз екстерно мешање (лабораторијска тресилица, 150 o/min), на температури од 25°C у трајању од 36 h. Квалитет припремљеног инокулума процењен је на основу промене мутноће, течљивости и боје хранљиве подлоге, а у медијуме за биосинтезу додат је у количини од 10% (v/v) рачунато на његову запремину.

### 4.4. Услови биосинтезе

Експерименти који су имали за циљ скрининг могућности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија (део 5.1) и формулацију састава култивационог медијума (делови 5.4.1. и 5.4.2) изведени су у ерленмајерима запремине 300 ml (радне запремине 100 ml) у трајању од 120 h, у аеробним условима, при температури од 28°C и брзини мешања од 150 o/min, која је обезбеђена постављањем ерленмајера на микробиолошку лабораторијску тресилицу (KS 4000i control, IKA® Werke, Germany).

Ток биосинтезе ксантана испитан је култивацијом одабраног производног соја у лабораторијском биореактору (Biostat® A plus, Sartorius AG, Germany) укупне запремине 3 l (радне запремине 2 l) са аутоматским мерењем и регулацијом процесних параметара, интерним мешањем помоћу две паралелно постављене Руштонове турбине, односом пречника мешалице (d) и пречника суда (D<sub>i</sub>) од 0,38 и без интерно постављених одбојника. Производња ксантана на појединачним фракцијама отпадних вода (део 5.3.1) изведена је у трајању од 120 h, у аеробним условима, при вредности рН одржаваној у опсегу од 6,0 до 8,0. У првих 48 h биопроцес се одвијао на температури од 25°C, при интензитету аерације од 1 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min након чега је температура повећана на 30°C, интензитет аерације на 2 l/l/min, а брзина мешања на 500 o/min. Култивација производног микроорганизма на намешаним отпадним водама винарија (делови 5.3.2. и 5.4.3) изведена је под идентичним условима у трајању од 96 h уз наведену корекцију вредности процесних параметара након 36 h биосинтезе.

Огледи чији је крајњи циљ оптимизација вредности процесних параметара (део 5.5.1) изведени су у лабораторијском биореактору (Chemar AG CH-8604, Volketswil, Switzerland) укупне запремине 7 l (радне запремине 5 l) са односом d/D<sub>i</sub> од 0,44 и четири вертикално постављена одбојника, у трајању од 96 h, у аеробним условима, при одржавању вредности рН у опсегу од 6,0 до 8,0. Биосинтеза ксантана се у првих 24 h одвијала на температури од 25°C (интерна регулација температуре), при интензитету аерације од 1 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min која је обезбеђена интерним мешањем помоћу две паралелно постављене Руштонове турбине на

растојању од 90 mm. Након овог периода вршена је корекција вредности наведених параметара у складу са примењеним експерименталним планом (табела 4.1).

## 4.5. Издајање производа

Узорци култивационих течности су центрифугирани при 10000 о/min у трајању од 30 минута (Rotina 380 R, Hettich, Germany), а затим је из добијеног супернатанта ксантан издвојен таложењем 96% (v/v) етанолом уз додатак zasiћеног раствора калијум-хлорида као електролита. По завршеном поступку таложења изведена је дехидратација талоба ксантана, његово издајање из таложне смеше, а затим сушење на 60°C (Додић и Граховац, 2013). На основу резултата гравиметријске методе одређен је садржај биосинтетисаног ксантана. За процену успешности биосинтезе у примењеним експерименталним условима израчуната је вредност конверзије извора угљеника у ксантан на основу једначине:

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

где је:

$K_{P/S}$  – степен конверзије извора угљеника у ксантан (%),

$P$  – садржај ксантана (g/l) и

$S_0$  – почетни садржај шећера (g/l).

## 4.6. Аналитички поступци

### 4.6.1. Анализа отпадних вода винарија

Отпадне воде прикупљене из различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина анализиране су у погледу параметара којима се уобичајено карактеришу отпадне воде винарија, али и у погледу параметара значајних за биотехнолошку производњу.

Вредност рН отпадних вода винарија измерена је стакленом електродом помоћу мултипараметарског лабораторијског анализатора Consort C863 (Consort, Belgium).

Садржај суве материје прикупљених сировина одређен је гравиметријски, сушењем на 105°C до постизања константне масе (Franson, 1998).

Садржај укупних суспендованих честица (TSS, енгл. Total Suspended Solids) у отпадним водама винарија одређен је гравиметријском методом. Узорци прикупљених отпадних токова су центрифугирани на 3000 о/min у трајању од 10 минута (Tehtnica LC-321, Železniki, Slovenia) након чега је добијени талог сушен на 105°C до постизања константне масе (Franson, 1998).

Хемијска потрошња кисеоника (COD, енгл. Chemical Oxygen Demand) одређена је волуметријском рефлукс методом са калијум-дихроматом као оксидационим средством (Franson, 1998).

Биохемијска потрошња кисеоника (BOD<sub>5</sub>, енгл. Biochemical Oxygen Demand) измерена је помоћу BOD анализатора (Velp Scientifica, Italy), а у складу са стандардном методом за одређивање овог параметра у отпадним водама (Franson, 1998).

Садржај укупних фенолних компоненти у отпадним водама из производње вина одређен је спектрофотометријском методом по Фолин-Чиолтеу (Folin-Ciocalteu) (Singleton et al., 1999) са галном киселином као стандардом.

Садржај редукујућих материја у отпадним водама винарија одређен је спектрофотометријском методом по Милеру (Miller, 1959) са еквимоларним раствором фруктозе и глукозе као стандардом.

Од редукујућих шећера у испитиваним сировинама одређене су фруктоза и глукоза HPLC инструменталном методом. Пре анализирања узорци отпадних вода су пропуштени кроз 0,45  $\mu\text{m}$  најлонски филтер (Agilent Technologies, Germany). HPLC инструмент опремљен је пумпом (HPG-3200SD/RS), аутосамплером (WPS-3000(T)SL) колоном (ZORBAX NH<sub>2</sub>; 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) и рефрактометријским детектором (RefractoMax520). Запремина инјектованог узорка износила је 10  $\mu\text{l}$ , а као мобилна фаза коришћен је 75% (v/v) ацетонитрил са протоком од 1,2 ml/min. Време елуције било је 20 минута, а температура колоне одржавана је на 25°C.

Садржај укупног азота у отпадним водама винарија одређен је методом по Кјелдалу (Kjeldahl) (Herlich, 1990).

Садржај асимилабилног азота, односно  $\alpha$ -амино и амонијачног азота, у течним ефлуентима индустрије вина одређен је волуметријском методом (Zoetkley et al., 1999).

Садржај укупног фосфора у отпадним водама винарија одређен је спектрофотометријском методом (Gales et al., 1966) са раствором анхидрованог калијум-дихидрогенфосфата као стандардом.

Садржај укупних растворених соли (TDS, енгл. Total Dissolved Solids) у отпадним токовима из производње вина измерен је кондуктометријском електродом помоћу мултипараметарског лабораторијског анализатора Consort C863 (Consort, Belgium).

Од минералних материја у отпадним водама винарија одређени су садржаји јона натријума, калијума, калцијума и магнезијума атомском апсорпционом спектрофотометријом (Franson, 1998).

#### 4.6.2. Анализа култивационе течности

Како би се испитао ток биосинтезе ксантана узорци култивационих течности су ради потребних анализа узимани у стерилним условима у дефинисаним временским интервалима, док су по завршетку биопроцеса медијуми анализирани у погледу параметара којима се процењује успешност биопроцеса. 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 o/min у трајању од 10 минута (Rotina 380 R, Hettich, Germany).

Садржај биомасе изражен је као број ћелија производног микроорганизма у култивационој течности који је одређиван методом посева (Врбашки и Марков, 1992) из три разблажења ( $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ) у три понављања.

Садржај редукујућих материја, од којих су најзаступљенији шећери фруктоза и глукоза, одређиван је у супернатанту култивационе течности спектрофотометријском методом по Милеру (Miller, 1959) са еквимоларним раствором поменутих шећера као стандардом. На основу резултата ових одређивања праћена је промена садржаја шећера у култивационој течности током биоси-

нтезе. За прорачун степена конверзије шећера збирни садржај фруктозе и глукозе у супернатанту култивационе течности одређиван је HPLC инструменталном методом при условима описаним у делу 4.6.1. Степен конверзије шећера рачунат је помоћу следеће једначине:

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

где је:

- $K_S$  – степен конверзије шећера (%),
- $S_0$  – почетни садржај шећера (g/l) и
- $S$  – резидуални садржај шећера (g/l).

Садржај укупног азота у супернатанту култивационе течности одређиван је методом по Кјелдалу (Herlich, 1990). На основу добијених резултата израчунат је степен конверзије укупног азота применом једначине:

$$K_N = \frac{N_{uk_0} - N_{uk}}{N_{uk_0}} \cdot 100 \quad (4.3)$$

где је:

- $K_N$  – степен конверзије укупног азота (%),
- $N_{uk_0}$  – почетни садржај укупног азота (mg/l) и
- $N_{uk}$  – резидуални садржај укупног азота (mg/l).

Садржај асимилабилног азота, односно  $\alpha$ -амино и амонијачног 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) са раствором анхидрованог калијум-дихидрогенфосфата као стандардом. Добијени резултати коришћени су за рачунање степена конверзије укупног фосфора на основу следеће једначине:

$$K_P = \frac{P_{uk_0} - P_{uk}}{P_{uk_0}} \cdot 100 \quad (4.4)$$

где је:

- $K_P$  – степен конверзије укупног фосфора (%),
- $P_{uk_0}$  – почетни садржај укупног фосфора (mg/l) и
- $P_{uk}$  – резидуални садржај укупног фосфора (mg/l).

Реолошке карактеристике узорака култивационих течности одређене су на основу резултата мерења ротационим вискозиметром "Reotest 2 RV-2" (Medingen GmbH, Deutschland) са коаксијалним цилиндричним мерним прибором ознаке N (Додић и Граховац, 2013). На основу очитаних вредности одклона казаљке за различите брзине смицања израчунате су вредности напона смицања помоћу следеће једначине:

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

где је:

- $\tau$  – напон смицања (Pa),
- $z$  – константа (3,08 dyn/cm<sup>2</sup>·Skt) и



$\alpha$  – отклон казаљке (Skt) .

Да би се утврдило псеудопластично понашање анализираних узорака и одредили реолошки параметри, фактор конзистенције и индекс тока, израчунате вредности напона смицања фитоване су степеним законом:

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

где је:

$\tau$  – напон смицања (Pa),  
 $K$  – фактор конзистенције (Pa·s<sup>n</sup>),  
 $D$  – брзина смицања (1/s) и  
 $n$  – индекс тока (1).

Фитовање података изведено је применом програма Microsoft® Excel 2010 (MS Office, Microsoft Corporaton, USA), а поклапање анализираних резултата са наведеном функционалном зависношћу процењено је на основу вредности коефицијента детерминације ( $R^2$ ).

Привидни вискозитет култивационе течности израчунат је на основу вредности реолошких параметара применом израза:

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

где је:

$\eta_a$  – привидни вискозитет (mPa·s),  
 $K$  – фактор конзистенције (Pa·s<sup>n</sup>),  
 $D$  – брзина смицања (145,8 1/s) и  
 $n$  – индекс тока (1).

#### 4.6.3. Анализа биосинтетисаног ксантана

Квалитет биосинтетисаног ксантана процењен је на основу средње вредности молекулских маса биополимера и вискозитета његових раствора.

Средња вредност молекулских маса ксантана одређена је мерењем времена истицања његових раствора различите концентрације у 0,1 М натријум-хлориду помоћу Убелодеовог (Ubbelohde) капиларног вискозиметра. Мерење је вршено у термостатираном воденом купатилу на температури од 25°C. На основу добијених резултата у програму Microsoft® Excel 2010 (MS Office, Microsoft Corporaton, USA) одређена је вредност унутрашњег вискозитета која је са молекулском масом биополимера повезана преко Марк-Хаувинкове (Mark-Houwink) једначине чије се константе одређују у складу са обликом макромолекула, природом растварача и температуром мерења. Стога је за рачунање молекулске масе ксантана у овим истраживањима коришћена следећа релација (Milas et al., 1985):

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

где је:

$[\eta]$  – унутрашњи вискозитет (l/g) и  
 $M_w$  – средња молекулска маса ксантана (g/mol).

Вискозитет 1% (w/v) раствора ксантана у 0,1 М натријум-хлориду ( $\eta_{sp}$ , Pa·s) одређен је на основу резултата мерења ротационим вискозиметром "Reotest 2 RV-2" (Medingen GmbH, Deutschland) са коаксијалним цилиндричним мерним прибором ознаке N (Додић и Граховац, 2013) на начин који је објашњен у делу 4.6.2.

## 4.7. Статистичка анализа

Експерименти који су имали за циљ скрининг могућности биосинтезе ксантана (део 5.1), испитивање тока биосинтезе ксантана (део 5.3), формулацију састава култивационог медијума (део 5.4) и проверу валидности оптимизационих резултата (део 5.5.4) изведени су у три понављања под идентичним условима, а добијени резултати представљени су у облику средњих вредности са стандардним одступањем. Сви подаци обрађени су применом неколико различитих статистичких тестова. За тестирање хипотезе о хомогености варијанси примењен је Левенов (Levene) тест. Пошто је потврђено да не постоји статистички значајна разлика у варијансама свих анализираних параметара ( $p > 0,05$ ) извршена је једнофакторијална анализа варијансе (One-Way ANOVA), а затим и накнадно (post-hoc) тестирање применом Данкановог (Duncan) теста вишеструких поређења којим су утврђене хомогене групе и значајност разлика између средњих вредности група у оквиру сваког од анализираних параметара. Како би се визуелно упоредиле варијације присутне унутар и између група обрађени подаци приказани су графички правоугаоним дијаграмима (Box & Whisker Plots). Статистичка анализа свим примењеним тестовима извршена је при нивоу значајности од 0,05. Средње вредности и стандардна одступања израчунати су у програму Microsoft® Excel 2010 (MS Office, Microsoft Corporation, USA), док је за статистичку обраду података и цртање правоугаоних дијаграма коришћен софтверски пакет Statistica 13 (Dell Inc., USA).

## 4.8. Математичко моделовање и оптимизација

Математички модели на основу којих су оптимизоване вредности жељених параметара дефинисани су на основу резултата статистички дизајнираних експеримената. У оквиру ових истраживања коришћен је Бокс-Бенкенов експериментални план (Box-Behnken Design) са три фактора на три нивоа и три понављања у централној тачки. Од фактора испитивани су температура биосинтезе ксантана ( $X_1$ , 25-35°C), интензитет аерације, односно проток ваздуха ( $X_2$ , 1,0-2,5 l/l/min) и брзина мешања култивационог медијума ( $X_3$ , 200-800 o/min). У табели 4.1. приказане су вредности наведених процесних параметара вариране у складу са примењеним експерименталним планом.

Као одзиви одабрани су садржај биомасе ( $Y_1$ , cfu/ml), садржај раствореног кисеоника ( $Y_2$ , %), садржај шећера ( $Y_3$ , g/l), садржај укупног азота ( $Y_4$ , mg/l), садржај асимилабилног азота ( $Y_5$ , mg/l), садржај укупног фосфора ( $Y_6$ , mg/l), привидни вискозитет медијума ( $Y_7$ , mPa·s), садржај ксантана ( $Y_8$ , g/l), молекулска маса ксантана ( $Y_9$ , g/mol) и привидни вискозитет раствора ксантана ( $Y_{10}$ , mPa·s). За дефинисање математичких модела коришћене су вредности наведених параметара одређене по завршетку биопроцеса.

Табела 4.1. Бокс-Бенкенов експериментални план и вариране вредности испитиваних параметара

Редни број огледа	Кодиране вредности			Вариране вредности		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Температура (°C)	Интензитет аерације (l/l/min)	Брзина мешања (o/min)
1	-1	-1	0	25	1,00	500
2	1	-1	0	35	1,00	500
3	-1	1	0	25	2,50	500
4	1	1	0	35	2,50	500
5	-1	0	-1	25	1,75	200
6	1	0	-1	35	1,75	200
7	-1	0	1	25	1,75	800
8	1	0	1	35	1,75	800
9	0	-1	-1	30	1,00	200
10	0	1	-1	30	2,50	200
11	0	-1	1	30	1,00	800
12	0	1	1	30	2,50	800
13	0	0	0	30	1,75	500
14	0	0	0	30	1,75	500
15	0	0	0	30	1,75	500

Резултати експерименталних одређивања фитовани су полиномом другог реда:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (4.9)$$

где су:

$Y_i$  – моделовани одзиви,

$X_{1-3}$  – испитивани фактори,

$b_0$  – одсечак,

$b_1, b_2, b_3$  –линеарни коефицијенти,

$b_{11}, b_{22}, b_{33}$  –квadratни коефицијенти и

$b_{12}, b_{13}, b_{23}$  –коефицијенти интеракције регресионе једначине.

Дефинисане зависности представљају математичке моделе који описују утицај испитиваних фактора на посматране одзиве. Успешност фитовања експерименталних резултата полиномом другог реда процењена је на основу вредности коефицијента детерминације ( $R^2$ ), док је значајност модела утврђена помоћу F-вредности и  $p$ -вредности. Математички модели приказани су и графички одзивним површинама које су цртане тако што је један од фактора имао константну вредност из центра плана док су преостала два фактора варирана. Значајност утицаја појединачних фактора као и њихових интеракција процењена је преко  $p$ -вредности за сваки од коефицијената у регресионој једначини, док је интензитет њиховог утицаја одређен поређењем  $t$ -вредности.

Статистичка обрада експерименталних података (анализа варијансе, ANOVA), дефинисање математичких модела и цртање одзивних површина урађени су применом софтверског пакета Statistica 13 (Dell Inc., USA). За оптимизацију фактора примењена је метода жељене функције (desirability function) у софтверском пакету Design-Expert® 8.1. (Stat-Ease, Inc., USA).

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

---

У првом делу овог поглавља приказани су резултати скрининга могућности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија и наведене су даље фазе истраживања чији ће резултати указати на могућност унапређења предложеног производног поступка. Стога су у другом делу дати резултати анализе састава отпадних вода генерисаних у неколико домаћих винарија током различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина, које су примењене као сировине у овим истраживањима. У трећем делу поглавља приказани су резултати испитивања тока биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа поменути ефлуенти. На основу показатеља успешности биопроцеса утврђени су критични параметри биосинтезе и селектоване су сировине са највећим потенцијалом примене у производњи ксантана. У четвртом делу представљени су огледи изведени са циљем формулације састава медијума на бази одабраних отпадних токова. Пети део поглавља посвећен је моделовању производње ксантана на отпадним водама винарија и оптимизацији вредности процесних параметара значајних за растворљивост кисеоника. Применом поступка одзивне површине, а на основу резултата испитивања тока биосинтезе ксантана на медијуму претходно формулисаниг састава при различитим условима, дефинисани су математички модели који описују утицај испитиваних параметара на умножавање биомасе, потрошњу нутријената, продукцију ксантана и његов квалитет. Добијени модели и метода жељене функције коришћени су за оптимизацију вредности температуре, интензитета аерације и брзине мешања при којима се остварује жељена ефикасност биопроцеса. Последња фаза истраживања обухватала је испитивање тока биосинтезе ксантана при оптималним условима како би се проверила валидност добијених резултата.

## 5.1. Скрининг могућности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија

Производња ксантана је карактеристична по неспецифичности угљенохидратног супстрата што омогућава да се његова биосинтеза успешно изводи на полусинтетичким подлогама са различитим изворима угљеника, али и на бројним отпадним токовима прехранбене индустрије (Palaniraj and Jayaraman, 2011). Литературни наводи упућују да су извори угљеника, азота и фосфора, који су инградијенти отпадних вода винарија, квалитативно и квантитативно одговарајући супстрати за неометану метаболичку активност бактерија рода *Xanthomonas*. Ипак, основна карактеристика свих ефлуената које генерише индустрија вина је присуство значајних количина укупних фенола који делују инхибиторно на метаболизам великог броја микроорганизама (de Heredia et al., 2005). Међутим, ако се узме у обзир да бактерије рода *Xanthomonas* поседују способност метаболисања фенолних компоненти при чему их користе као изворе угљеника (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996) идеја о могућности примене отпадних вода винарија као сировина за производњу ксантана је оправдана. Стога су прелиминарна истраживања из оквира ове докторске дисертације обухватала скрининг могућности биосинтезе ксантана на поменути ефлуентима (Рончевић и сар., 2015).

Култивација референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 изведена је на отпадним водама из различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина без разблаживања и додатног обогаћивања (део 4.2). Могућност биосинтезе ксантана у примењеним условима потврђена је променом реологије култивационог медијума, док је успешност изведеног бипроцеса процењена на основу количине издвојеног биополимера. Резултати ових одређивања дати су у табели 5.1.

Табела 5.1. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија

Отпадна вода		n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	$\eta_a$ (mPa·s)	P (g/l)
производња белог вина	муљање	0,6291	0,0575	9,06±0,25	2,19±0,24
	пресовање	0,5578	0,0840	9,28±0,24	2,56±0,20
	флотација	0,4808	0,2594	19,52±0,30	4,82±0,32
	ферментација	0,6082	0,0857	12,17±0,18	2,44±0,21
	претакање	0,7445	0,0110	3,08±0,18	2,00±0,16
производња розе вина	муљање	0,4857	0,2406	18,56±0,20	4,57±0,35
	пресовање	0,5411	0,1676	17,03±0,22	3,38±0,24
	таложeње	0,6558	0,0821	14,78±0,28	2,61±0,25
	ферментација	0,7530	0,0153	4,47±0,26	2,07±0,24
	претакање	0,5097	0,1349	11,73±0,11	3,25±0,31
производња црвеног вина	муљање	0,5258	0,1837	17,30±0,26	3,89±0,30
	ферментација	0,7351	0,0161	4,30±0,27	2,04±0,11
	претакање	0,6607	0,0186	3,43±0,32	2,27±0,22

За култивационе течности ксантана је карактеристично да се понашају као нењутновски флуиди који, чак и при ниским концентрацијама, показују псевдопластичан тип протикања. Код псевдопластичних флуида напон смицања много брже расте при малим брзинама смицања него при

великим, па се ова зависност најчешће покорава степеном закону (García-Ochoa et al., 2000). Како би се утврдило да ли се добијене култивационе течности понашају као псеудопластични системи резултати реолошких мерења фитовани су наведеном функционалном зависношћу (део 4.6.2). Високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,970$ ) указују на веома добро поклапање мерених вредности са жељеним моделом чиме је потврђен псеудопластичан карактер испитиваних узорака. Међутим, реолошке карактеристике ксантанових култивационих течности много боље илуструју вредности индекса тока и фактора конзистенције које су добијене како је наведено у делу 4.6.2. овог рада.

Индекс тока је реолошки параметар који представља меру одступања понашања флуида од њутновског. За псеудопластичне системе вредност овог параметра налази се између нула и један при чему веће одступање од јединице указује на израженији псеудопластични карактер (Singh and Heldman, 2009). Вредности индекса тока приказане у табели 5.1. налазе се у интервалу од 0,4808 до 0,7530 чиме је доказано да све анализиране култивационе течности показују псеудопластичан тип протицања што је несумњива потврда да је у примењеним условима дошло до биосинтезе ксантана.

Вискозитет раствора ксантана у великој мери зависи од концентрације биополимера, али и од његове структуре, а самим тим и квалитета (Mark, 2014). Фактор конзистенције је, такође, значајан реолошки параметар, а управо је пропорционалан вискозитету (García-Ochoa et al., 2000). Будући да су разлике између вредности овог параметра велике (табела 5.1) на први поглед могу се тумачити различитим садржајем биосинтетисаног ксантана. Са друге стране, ако се узме у обзир да су испитиване сировине значајно различитог састава (Vlyssides et al., 2005), као и то да структура ксантана зависи од доступне количине усвојивих нутријента (Palaniraj and Jayaraman, 2011), уочене разлике у факторима конзистенције и индиректно вискозитетима могу бити последица и различитог квалитета биосинтетисаног ксантана.

На основу вредности индекса тока и фактора конзистенције израчунати су привидни вискозитети култивационих течности (део 4.6.2), а добијени резултати приказани су у табели 5.1. С обзиром да и привидни вискозитет медијума не зависи само од количине синтетисаног биополимера већ и од његовог квалитета (García-Ochoa et al., 2000), вредности овог параметра упоређене су садржајем ксантана у култивационим течностима. Анализа ове две групе резултата указује да уочене разлике у привидним вискозитетима нису последица само различите количине синтетисаног биополимера већ и квалитета.

Садржај ксантана у култивационим течностима по завршетку биопроцеса кретао се у интервалу од 2,00 g/l до 4,82 g/l (табела 5.1). Поређењем добијених резултата може се уочити да количина продукованог ксантана веома варира када се посматрају све испитиване фракције отпадних вода из производње једног вина, али и када се посматра нека од фракција која настаје у истој фази производног процеса код све три врсте вина, што је последица различитог састава појединачних отпадних токова винарија (Vlyssides et al., 2005). Међутим, чињеница да је у примењеним условима дошло до биосинтезе ксантана указује да се на отпадним водама винарија без претходног третмана метаболизам одабраног производног соја несметано одвијао те да није уочен предименициониран негативан ефекат свих евентуално присутних ометајућих фактора што течне ефлуенте индустрије вина чини потенцијално могућим сировинама за производњу овог тржишно вредног биополимера.

Иако добијени резултати потврђују могућност биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија, неопходна су додатна истраживања како би се повећала ефикасност биопроцеса. На првом месту потребно је извршити карактеризацију течних ефлуената који се генеришу током различитих

фаза производње белог, розе и црвеног вина на основу које би се проценио квалитет сировина доступних на нашем тржишту првенствено са становишта њихове потенцијалне примене као сировине за биотехнолошку производњу. Прецизно дефинисање састава отпадних вода винарија уједно је и најзначајнији корак приликом формулације медијума за производњу ксантана чија би основа били управо ови отпадни токови. Третмани којима би се могао постићи оптималан садржај најзначајнијих нутријената за биосинтезу јесу разблаживање, обogaћивање или намешавање вода. Након дефинисања састава медијума производња ксантана може се побољшати оптимизацијом вредности процесних параметара одговорних за садржај раствореног кисеоника.

## 5.2. Састав отпадних вода винарија

Отпадне воде које се генеришу током производње вина су ефлуенти нестандардног састава што је последица утицаја великог броја фактора. Управо због значајних варијација количине загађујућих материја у литератури не постоје прецизни подаци о саставу ових отпадних токова. Будући да су за припрему медијума за биотехнолошку производњу, чија су основа комплексне сировине, неопходне тачне вредности садржаја оних састојака који су од значаја за одабрани биопроцес, отпадне воде из домаћих винарија скупљене током различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина анализирани су у погледу параметара којима се уобичајено карактеришу ефлуенти ове гране индустрије (EPA, 2004). Добијени резултати приказани су у табелама 5.2-5.4. Према доступним научним и стручним литературним наводима, не постоје подаци који се односе на карактеризацију отпадних вода које индустрија вина генерише на нашој територији, изузев оних који су одређени током експерименталних истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом (Puškaš et al., 2015).

Резултати приказани у табелама 5.2-5.4. потврђују литературне податке да састав отпадних вода винарија зависи од врсте вина које се производи (Bories and Sire, 2010), али и од фазе производње која је у току (Vlyssides et al., 2005). У табели 5.2. представљени су резултати анализе отпадних вода које су генерисане приликом производње белог вина у истој винарији идентичном технологијом током две узастопне године. Како су се карактеристике ових отпадних вода разликовале доказани су литературни наводи да састав ефлуената у оквиру једне винарије варира на годишњем нивоу (Strong, 2008). Осим наведеног, карактеристике отпадних токова винарија зависе и од примењеног поступка производње (Bories and Sire, 2010) што потврђују резултати дати у табели 5.3. У овој табели приказан је састав отпадних вода насталих током производње розе вина у две винарије код којих се бистрење шире врши на различите начине. Током 2014. године отпадни токови узорковани су у винарији у којој се шира бистри таложењем уз додаток пектолитичких ензима, док су ефлуенти скупљени наредне године пореклом из винарије где се за бистрење шире користи флотација. С обзиром да су се анализирани узорци значајно разликовали по свом саставу јасно је да начин бистрења шире у великој мери утиче на карактеристике отпадних вода винарија.

На основу резултата датих у табелама 5.2-5.4. може се уочити да вредности рН отпадних вода које се генеришу током производње вина у домаћим винаријама веома варијају, а налазе се у интервалу од 3,41 до 8,50 што је према резултатима других аутора у оквиру уобичајеног опсега (Mosse et al., 2011). Услед губитка шире и самог вина чија је вредност рН од 3,50 до 5,50 отпадне воде винарија су најчешће киселог карактера. Међутим, у случајевима када се за прање опреме и танкова користе изразито алкална средства вредност рН течних ефлуената из производње вина може бити и у базном подручју (Charman et al., 2001). Резултати добијени у оквиру ових истраживања указују да су веома ниске вредности рН (мање од 4,00) карактеристичне за отпадне воде које се генеришу током прања танкова након бистрења шире и претакања вина, док су вредности овог параметра измерене у осталим ефлуентима приметно веће.

Табела 5.2. Састав отпадних вода из различитих фаза производње белог вина

Параметар	Берба 2014. године				
	муљање	пресовање	флотација	ферментација	претакање
рН (1)	6,98	8,50	3,60	5,90	3,60
Сува материја (mg/l)	3250,00	5436,00	121000,00	12300,00	59300,00
TSS (mg/l)	832,00	1756,00	83590,00	3800,00	40590,00
COD (mg/l)	6570,00	3280,00	220500,00	58340,00	185000,00
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	1810,00	1000,00	145000,00	23200,00	22100,00
Укупни феноли (mg/l)	23,00	25,00	116,00	53,00	205,00
Редукујуће материје (g/l)	4,02	4,64	147,80	2,54	2,37
Укупни шећери (g/l)	3,92	3,79	144,42	0,00*	0,00*
Фруктоза (g/l)	2,08	1,93	70,77	0,00*	0,00*
Глукоза (g/l)	1,84	1,86	73,65	0,00*	0,00*
Укупан азот (mg/l)	91,00	105,00	2310,00	527,00	2744,00
Асимилабилан азот (mg/l)	23,00	14,00	504,00	102,00	168,00
Укупан фосфор (mg/l)	9,20	8,80	157,00	107,00	272,00
TDS (mg/l)	559,00	619,00	1570,00	1400,00	2410,00
Натријум (mg/l)	8,60	9,70	7,00	9,30	30,00
Калијум (mg/l)	47,00	109,00	924,00	626,00	1105,00
Калцијум (mg/l)	62,00	105,00	118,00	30,00	37,00
Магнезијум (mg/l)	29,00	41,00	101,00	41,00	53,00
	Берба 2015. године				
	муљање	пресовање	флотација		
рН (1)	7,02	7,24	3,41		
Сува материја (mg/l)	1271,00	639,00	110630,00		
TSS (mg/l)	304,00	128,00	75512,00		
COD (mg/l)	5346,00	4950,00	265320,00		
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	1400,00	2200,00	20000,00		
Укупни феноли (mg/l)	0,00*	22,00	790,00		
Редукујуће материје (g/l)	4,01	5,52	171,05		
Укупни шећери (g/l)	3,48	4,27	167,65		
Фруктоза (g/l)	1,82	2,08	85,75		
Глукоза (g/l)	1,66	2,19	81,90		
Укупан азот (mg/l)	210,00	231,00	1988,00		
Асимилабилан азот (mg/l)	12,60	9,80	481,60		
Укупан фосфор (mg/l)	5,10	5,39	172,65		
TDS (mg/l)	433,00	453,00	1650,00		
Натријум (mg/l)	7,40	8,10	7,10		
Калијум (mg/l)	38,60	68,90	980,70		
Калцијум (mg/l)	49,10	51,80	120,40		
Магнезијум (mg/l)	24,60	30,60	108,60		

\* Није детектовано



Табела 5.3. Састав отпадних вода из различитих фаза производње розе вина

Параметар	Берба 2014. године				
	муљање	пресовање	таложeње	ферментација	претакање
pH (1)	5,85	5,90	3,50	7,25	3,70
Сува материја (mg/l)	6300,00	8420,00	18620,00	7400,00	16700,00
TSS (mg/l)	2350,00	3500,00	11190,00	2960,00	11680,00
COD (mg/l)	20300,00	37000,00	73000,00	41700,00	105500,00
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	11100,00	17600,00	31350,00	17000,00	6400,00
Укупни феноли (mg/l)	96,00	130,00	192,00	85,00	310,00
Редукујуће материје (g/l)	29,47	16,23	49,00	0,71	1,38
Укупни шећери (g/l)	26,81	14,08	47,11	0,00*	0,00*
Фруктоза (g/l)	13,13	7,24	15,92	0,00*	0,00*
Глукоза (g/l)	13,68	6,84	31,19	0,00*	0,00*
Укупан азот (mg/l)	336,00	203,00	252,00	518,00	2100,00
Асимилабилан азот (mg/l)	42,00	82,00	154,00	49,00	87,00
Укупан фосфор (mg/l)	34,00	26,00	33,50	78,00	219,00
TDS (mg/l)	627,00	548,00	2880,00	3330,00	2945,00
Натријум (mg/l)	10,00	10,50	8,50	970,00**	19,00
Калијум (mg/l)	409,00	382,00	754,00	1394,00	1297,00
Калцијум (mg/l)	56,00	42,00	55,00	19,00	40,00
Магнезијум (mg/l)	21,00	20,00	31,00	31,00	44,00
	Берба 2015. године				
	муљање	пресовање	флотација		
pH (1)	6,35	6,88	3,49		
Сува материја (mg/l)	2570,00	1053,00	89556,00		
TSS (mg/l)	692,00	308,00	57480,00		
COD (mg/l)	10296,00	3960,00	285120,00		
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	2800,00	1650,00	40000,00		
Укупни феноли (mg/l)	25,00	27,00	540,00		
Редукујуће материје (g/l)	7,79	3,06	194,49		
Укупни шећери (g/l)	5,07	2,38	180,78		
Фруктоза (g/l)	0,00*	1,09	88,64		
Глукоза (g/l)	5,07	1,29	92,14		
Укупан азот (mg/l)	224,00	203,00	1610,00		
Асимилабилан азот (mg/l)	11,20	4,20	355,60		
Укупан фосфор (mg/l)	10,75	1,71	217,43		
TDS (mg/l)	495,00	403,00	1620,00		
Натријум (mg/l)	8,00	9,10	7,50		
Калијум (mg/l)	320,00	290,00	460,00		
Калцијум (mg/l)	69,40	38,80	31,00		
Магнезијум (mg/l)	18,90	17,40	19,30		

\* Није детектовано

\*\* За прање ферментационог танка коришћен је раствор натријум-хидроксида

Табела 5.4. Састав отпадних вода из различитих фаза производње црвеног вина

Параметар	Берба 2014. године		
	муљање	ферментација	претакање
pH (1)	5,90	7,10	3,50
Сува материја (mg/l)	5440,00	2256,00	72820,00
TSS (mg/l)	1520,00	750,00	54400,00
COD (mg/l)	13450,00	10200,00	151000,00
BOD <sub>5</sub> (mg/l)	7250,00	2800,00	25000,00
Укупни феноли (mg/l)	34,00	39,00	540,00
Редукујуће материје (g/l)	10,41	0,10	2,02
Укупни шећери (g/l)	7,16	0,00*	0,00*
Фруктоза (g/l)	3,60	0,00*	0,00*
Глукоза (g/l)	3,56	0,00*	0,00*
Укупан азот (mg/l)	119,00	77,00	2590,00
Асимилабилан азот (mg/l)	23,00	11,00	203,00
Укупан фосфор (mg/l)	22,03	7,70	337,64
TDS (mg/l)	882,00	849,00	3420,00
Натријум (mg/l)	8,60	8,20	9,50
Калијум (mg/l)	152,00	178,00	1051,00
Калцијум (mg/l)	36,00	20,00	44,00
Магнезијум (mg/l)	30,00	27,00	57,00

\* Није детектовано

Значајни показатељи квалитета отпадних вода винарија јесу садржај суве материје и садржај укупних суспендованих честица. Резултати приказани у табелама 5.2-5.4. показују да су вредности наведених параметара у отпадним токовима из наших винарија (сува материја 639-121000 mg/l и TSS 128-75512 mg/l) углавном изнад просечних вредности (Mosse et al., 2011). Добијени резултати указују да око 20-40% суве материје већине анализираних ефлуената чине суспендоване честице. Изузетак су отпадне воде генерисане током прања танкова након бистрења шире и претакања вина у којима суспендоване честице чине 60-75% суве материје. С обзиром да се у овим фазама винификације уклањају значајне количине суспендованих материја из шире и вина остварени резултати су очекивани. Такође, утврђено је да када се као техника за бистрење шире користи флотација настале отпадне воде садрже много више суспендованих честица у односу на ефлуенте генерисане током прања танка након бистрења шире таложењем уз додатак пектолитичких ензима. Како висок садржај суспендованих честица често представља проблем за ефикасну реализацију примењеног биолошког третмана (Day et al., 2011), припреми медијума у оквиру ових истраживања претходило је уклањање поменутих материја из отпадних вода у којима је њихова вредност највећа као што је наведено у делу 4.2. ове дисертације.

Генерално, отпадне воде винарија носе значајно органско оптерећење које се може проценити на основу вредности хемијске и биохемијске потрошње кисеоника (Day et al., 2011). Отпадни токови анализирани у оквиру ових истраживања садржали су велике количине органских материја што потврђују високе вредности поменутих параметара (COD 3280-285120 mg/l и BOD<sub>5</sub> 1000-145000 mg/l). Према литературним подацима органски материјал присутан у отпадним водама винарија пореклом је из грожђа или вина. За повећање органског оптерећења ових

отпадних токова углавном су одговорни ферментабилни шећери, а значајан утицај има и присуство етанола и органских киселина (Malandra et al., 2003). Доказано је да садржај и извор загађујућих органских материја у течним ефлуентима винарија зависе од врсте вина које се производи. Тако, код производње белих и розе вина на почетку бербе високе вредности хемијске потрошње кисеоника последица су великог садржаја шећера, док садржај етанола утиче у много мањој мери. Како се период бербе приближава крају садржај шећера постаје занемарљив, а етанол постаје главни извор органског оптерећења (Bories and Sire, 2010). Резултати приказани у табелама 5.2. и 5.3. потврђују наведене литературне податке. Садржај ферментабилних шећера у отпадним водама које су генерисане током производње шире кретао се од 2,38 g/l до 180,78 g/l, док у осталим ефлуентима из производње белог и розе вина примењеном инструменталном техником није детектовано присуство ових једињења. Са друге стране, у производњи црвених вина етанол је главна компонента одговорна за високу хемијску потрошњу кисеоника од самог почетка винификације, а удео са којим утиче на вредност овог параметра повећава се са временом (Bories and Sire, 2010). Ово потврђују веома ниске вредности садржаја шећера (мање од 7,16 g/l) у свим анализираним отпадним водама из производње црвеног вина (табела 5.4).

Од ферментабилних шећера у отпадним водама које се генеришу током производње вина у винаријама на нашој територији детектоване су глукоза и фруктоза (табеле 5.2-5.4.), док литературни наводи указују да се у овим ефлуентима врло ретко може пронаћи и малтоза (Malandra et al., 2003). Поменути редукујући моносахариди у отпадним водама винарија приближно се налазе у еквимоларним количинама (Mosse et al., 2011) што је потврђено и у оквиру ових истраживања. Отпадни токови настали приликом прања танкова након бистрења шире у поређењу са осталим ефлуентима изразито су богати глукозом и фруктозом. Ипак, значајно већи садржај шећера одређен је у отпадним водама које се генеришу у винаријама где се бистрење шире изводи флотацијом (144,42-180,78 g/l) у односу на ефлуенте винарије у којој се шира бистри таложењем (47,11 g/l).

Органске материје присутне у отпадним водама винарија углавном су биоразградивог карактера (Zhang et al., 2008). Биоразградивост течних ефлуената који се генеришу током производње вина може се проценити на основу односа  $BOD_5/COD$ . Уколико је овај однос већи од 0,5 сматра се да се отпадни ток може лако разградити применом неког од биолошких третмана (Chan et al., 2009). На основу вишемесечног истраживања утврђено је да је однос  $BOD_5/COD$  у отпадним водама винарија највећи током периода бербе због присуства шећера и етанола (Oliveira et al., 2009). Сличан закључак може се извести уколико се упореде вредности за хемијску и биохемијску потрошњу кисеоника дате у табелама 5.2-5.4. Међутим, може се уочити и да присуство већих количина фенола у отпадним водама винарија значајно смањује однос  $BOD_5/COD$ , а самим тим и могућност њихове разградње биолошким путем. Резултати приказани у поменути табелама указују да отпадне токове у којима је садржај фенолних компоненти већи од 200 mg/l карактерише однос  $BOD_5/COD$  мањи од 0,2 што указује на отежану биодеградацију органских материја из ових ефлуената. То се може објаснити чињеницом да у присуству већих количина фенолних једињења долази до инхибиције метаболичке активности великог броја микроорганизама чиме се и биолошка разградња отпадних вода одвија споријим интензитетом (de Heredia et al., 2005).

Према резултатима приказаним у табелама 5.2-5.4. садржај укупних фенола у анализираним ефлуентима кретао се од 0 mg/l до 790 mg/l што је у оквиру уобичајених вредности за садржај ових компоненти у отпадним водама винарија (Mosse et al., 2011). Значајне количине фенолних једињења детектоване су у отпадним токовима скупљеним током прања танкова након претакања вина (205-540 mg/l). Поређењем ових резултата потврђен је литературни податак да се у производњи црвених вина генеришу отпадне воде са много већим садржајем фенола

(Vlyssides et al., 2005). Поред тога, у производњи белих и розе вина ефлуенти веома богати фенолним компонентама настају и приликом прања танкова након бистрења шире (116-790 mg/l) што је последица њихове екстракције из бобица и семенки грожђа (Ioannou et al., 2015).

Услед просипања шире и коначног производа, али и њиховог заостајања у танковима у отпадне воде винарија могу доспети и значајне количине нутријената, углавном азота и фосфора (Day et al., 2011). У испитиваним отпадним токовима садржај укупног азота кретао се у интервалу од 77,0 mg/l до 2744,0 mg/l (табеле 5.2-5.4.). Поређењем добијених резултата са резултатима других истраживања (Mosse et al., 2011) јасно је да се на нашој територији током производње вина генеришу ефлуенти са много већим садржајем овог нутријента. Највеће количине азота утврђене су у отпадним водама скупљеним приликом прања танкова након бистрења шире флотацијом (1610,0-2310,0 mg/l) и претакања вина (2100,0-2744,0 mg/l). Ови резултати су очекивани будући да је специфична компонента поменутих ефлуената вински талог који је изразито богат азотом услед присуства агенаса за бистрење, протеина грожђа и ћелија квасца (Bustamante et al., 2005).

На основу вредности садржаја укупног азота не може се проценити која количина овог нутријента може бити разграђена применом неког од биолошких третмана. Стога су прикупљени отпадни токови анализирани и у погледу садржаја асимилабилног азота који је у табелама 5.2-5.4. представљен као збир аминок и амонијачног азота. С обзиром да се ова вредност кретала од 4,2 mg/l до 504,0 mg/l потврђено је да је количина лако усвијивог азота у отпадним водама винарија много мања у односу на укупан азот (Zhang et al., 2008). На основу добијених резултата може се претпоставити да је микробиолошким путем могуће разградити највише 25% азотних једињења присутних у испитиваним течним ефлуентима индустрије вина што свакако зависи од примењеног биокатализатора и конкретних услова третмана.

Према резултатима датим у табелама 5.2-5.4. садржај укупног фосфора у испитиваним отпадним токовима налазио се у интервалу од 1,71 mg/l до 337,64 mg/l. Анализом добијених резултата евидентно је да се приликом прања танкова након претакања вина генеришу отпадни токови који садрже много већу количину фосфора (219,00-337,64 mg/l) у односу на доступне литературне податке (Mosse et al., 2011). Значајне количине фосфора детектоване су и у отпадним водама скупљеним током прања танкова након бистрења шире флотацијом (157,00-217,43 mg/l). Како су протеини грожђа у мањој мери и извори фосфора (Day et al., 2011) поменути резултати су у складу са очекивањима.

Укупне растворене соли чине значајан део неорганског оптерећења течних ефлуената индустрије вина. Њихово присуство у овим отпадним токовима последица је просипања некавалитетног производа, али и чишћења алкалним средствима и водом лошег квалитета (Charman et al., 2001). Резултати приказани у табелама 5.2-5.4. указују да се током производње вина у домаћим винаријама генеришу отпадне воде са садржајем растворених соли од 403 mg/l до 3420 mg/l. Може се уочити да отпадни токови богати раствореним солима углавном настају приликом прања танкова након бистрења шире (1570-2880 mg/l) и претакања вина (2410-3420 mg/l). Међутим, у зависности од начиња чишћења и у ефлуентима из других фаза производног поступка садржај соли може бити изнад уобичајеног просека (Mosse et al., 2011).

Од јона који утичу на салинитет отпадних вода винарија у оквиру ових истраживања одређивани су садржаји натријума, калијума, калцијума и магнезијума (табеле 5.2-5.4.). Детектоване количине јона натријума (7,0-970,0 mg/l) и калијума (38,6-1394,0 mg/l) у течним ефлуентима индустрије вина веома варирају, а зависе првенствено од агенаса који се користе за чишћење опреме и танкова (Mosse et al., 2011). Имајући у виду да се у шири и вину налазе се значајне количине јона калијума (Arienzo et al., 2009) јасно је зашто су утврђене много веће концентрације овог минерала у свим

испитиваним отпадним водама винарија. У отпадним токовима генерисаним током производње неколико домаћих вина присутне су и одређене количине јона калцијума (19,0-120,4 mg/l) и магнезијума (17,4-108,6 mg/l), углавном пореклом из шире и вина (Mosse et al., 2011).

Резултати анализе састава отпадних вода које се генеришу током различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина приказани у табелама 5.2-5.4. указују да наведени ефлуенти носе значајно органско и неорганско оптерећење. Према Уредби о граничним вредностима емисије загађујућих материја у воде и роковима за њихово достизање, која важи на територији Републике Србије, а објављена је у "Службеном гласнику РС", бр. 48/12 од 11.05.2012. године, испитиване отпадне воде винарија нису погодне за испуштање у површинске воде и јавну канализацију без претходне обраде. Са друге стране, вредности садржаја шећера, азота, фосфора и минералних материја указују да течни ефлуенти индустрије вина који се генеришу на територији Фрушкогорског виногорја по свом саставу представљају погодне сировине за припрему култивационих медијума за производњу ксантана.

У зависности од садржаја нутријента које захтева предложени биотехнолошки поступак скупљене отпадне воде винарија могу се поделити у две групе. Прву групу чине ефлуенти који садрже све нутријенте неопходне за формулисање медијума за биосинтезу ксантана. Ови отпадни токови генеришу се током прања муљаче када се прерађује грожђе за производњу розе вина, али и приликом испирања танкова након бистрења шире без обзира на примењену технологију и вино које се производи. У другу групу спадају све отпадне воде које нису наведене. Оне се могу користити као извор азота, фосфора, минералних материја и као процесна вода, док је за неометану синтезу биополимера неопходно додати одговарајућу количину извора угљеника.

### 5.3. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија

Ток култивације референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 у лабораторијском био-реактору (део 4.4) на отпадним водама које се генеришу у различитим фазама производње белог, розе и црвеног вина испитан је како би се утврдили критични параметри биосинтезе ксантана и селектовали ефлуенти на којима ће се вршити даља истраживања са циљем унапређења предложеног производног поступка. У току биосинтезе узорци култивационих течности анализирани су у погледу садржаја најзначајнијих нутријента, као и у погледу реолошких карактеристика. Будући да метаболичка активност производног соја у највећој мери зависи од количине шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора (Rosalam and England, 2006), промена њиховог садржаја у култивационом медијуму пружила је јасну слику о правцу одвијања биопроцеса у примењеним експерименталним условима. Са друге стране, на основу промене вредности реолошких параметара, индекса тока и фактора конзистенције, али и повећања вискозитета система, што је последица продукције биополимера (Becker et al., 1998), индиректно је процењен интензитет биосинтезе ксантана. Иако се на основу вредности вискозитета медијума не добија тачан податак о количини синтетисаног биополимера, једноставност извођења и веома брз одзив су разлог због чега се производња ксантана на лабораторијском и индустријском нивоу прати управо на основу промене овог параметра (Salamone, 1996). Од показатеља успешности биопроцеса у овој фази истраживања одређивани су количина биосинтетисаног ксантана, степен конверзије шећера у биополимер, као и укупне конверзије сваког од испитиваних нутријента.

Будући да је ксантан секундарни метаболит, култивација сојева *Xanthomonas campestris* је специфична у погледу састава медијума. За производњу овог биополимера користе се медијуми

којима се фаворизује биосинтеза уз ограничен раст биомасе (Rosalam and England, 2006). Пошто су резултати прелиминарних истраживања показали да се метаболизам одабраног производног соја несматано одвија на отпадним водама винарија без претходног разблаживања и обогаћивања, а накнадном анализом састава коришћених сировина је утврђено да испитивани ефлуенти садрже довољне количине азота, фосфора и минералних материја за успешно извођење биосинтезе ксантана, припрема медијума у наставку истраживања подразумевала је само корекцију садржаја извора угљеника, додаток средства за пуферовање, подешавање вредности рН и стерилизацију (део 4.2).

### 5.3.1. Испитивање тока биосинтезе ксантана на појединачним отпадним водама винарија

Имајући у виду да максимална количина биосинтетисаног ксантана у култивационој течности по завршетку биопроцеса износи око 30 g/l (Sherley and Priyadharshini, 2015), као и то да се у индустријској производњи тежи остваривању степена конверзије извора угљеника у жељени производ од око 50-85% (Rosalam and England, 2006), јасно је да примена медијума са великим почетним садржајем шећера у овом биотехнолошком процесу није оправдана. Стога је испитивање тока биосинтезе ксантана изведено на медијумима са почетним садржајем шећерних компоненти од 25 g/l, а који су у својој основи садржали појединачне фракције отпадних вода генерисаних током различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина (део 4.2).

С обзиром да је ксантан секундарни метаболит до његове биосинтезе долази услед физиолошких промена ћелија производног соја изазваних ограничавањем садржаја одређених нутријената, али и променом процесних услова (Lo et al., 1997). Будући да је припрема медијума у оквиру ових истраживања подразумевала само корекцију садржаја шећера, али не и количине лимитирајућих нутријената попут азота и фосфора, интензивирање секундарног метаболизма, а самим тим и продукције ксантана изведено је вођењем биопроцеса у две фазе, односно при два различита сета процесних услова (део 4.4). У првој фази су температура, интензитет аерације и брзина мешања подешени тако да одговарају ћелијама за раст и уможавање, док су у другој фази кориговани на вредност која је према литературним подацима препоручена за синтезу овог биополимера (García-Ochoa et al., 2000). Како је време предвиђено за извођење сваког огледа у оквиру фазе истраживања износило 120 h, одговарајућа корекција вредности процесних параметара вршена је након 48 h култивације. Заједничко за обе фазе биосинтезе јесте одржавање вредности рН у неутралном подручју, односно између 6,0 и 8,0 јер се у том опсегу метаболичка активност бактерија рода *Xanthomonas* несматано одвија (Mirik et al., 2011). Важно је напоменути да током култивације референтног соја у примењеним експерименталним условима није вршена корекција вредности рН ниједног од испитиваних медијума чиме је доказано да је додата количина калцијум-карбоната довољна да одржи вредност поменутог параметра у границама оптималним за ефикасну продукцију ксантана током читавог трајања биопроцеса.

Непосредно након промене услова уочено је формирање густе пене на површини култивационе течности у огледима где су као медијуми примењене отпадна вода од прања танка након бистрења шире флотацијом из производње белог вина и отпадни токови скупљени приликом прања танкова након претакања све три врсте вина. Може се претпоставити да су интензивнији услови аерације и мешања довели до пенушања ових медијума управо због високог садржаја протеина у ефлуентима коришћеним за њихову припрему (Bustamante et al., 2005). Уочена појава је значајна из угла вођења биотехнолошког процеса будући да је формирање пене проблем који захтева дозирање антипенушаваца, а који ако се додају у великим количинама негативно утичу на пренос масе кисеоника што за последицу има смањење продукције ксантана (Hsu, 2003).

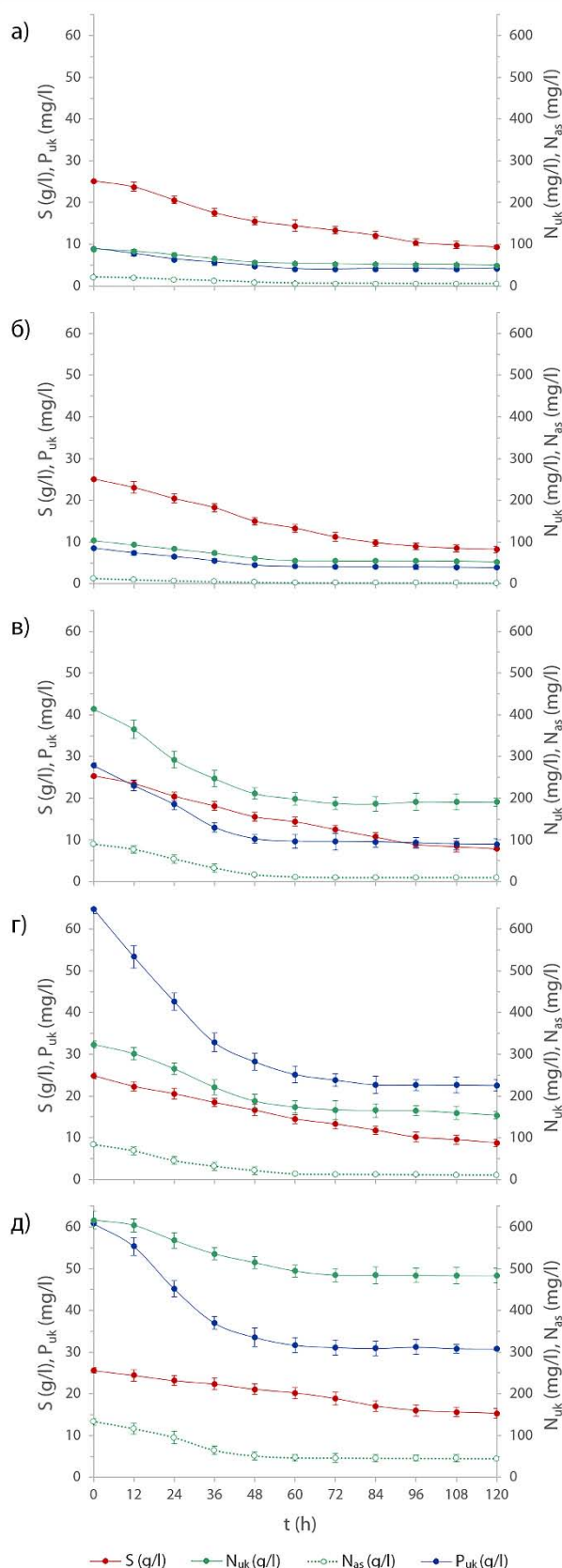
### 5.3.1.1. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих фаза производње белог вина

На слици 5.1. (а-д) приказана је промена садржаја шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина скупљене током прања муљаче, пресе и танкова након бистрења шире флотацијом, ферментације и првог претакања вина, редоследом.

Резултати приказани на поменутој слици указују, а статистички тестови потврђују да се садржај шећера у свим испитиваним медијумима значајно мењао током трајања биопроцеса ( $p < 0,001$ ). Иако се количина овог нутријента доступна микроорганизмима на самом почетку култивације није статистички значајно разликовала међу медијумима ( $p = 0,517$ ), динамика његове промене током биосинтезе није била иста што је вероватно последица различитих концентрација осталих битних нутријената у свим испитиваним ефлуентима (табела 5.2.). У медијумима чија су основа отпадне воде од прања муљаче (слика 5.1. а) и танка након претакања вина (слика 5.1. д) у току првих 12 h култивације садржај шећера се није значајно мењао што потврђују  $p$ -вредности од 0,070 и 0,262, редоследом. Након наведеног периода у медијуму на бази отпадног тока са муљаче услед метаболичке активности примењеног производног соја садржај шећера се интензивно смањивао до 96 h култивације ( $p < 0,001$ ) после чега његова промена није била статистички значајна ( $p = 0,171$ ). Резидуални садржај шећера у овом медијуму износио је 9,40 g/l. У медијуму чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина, значајна, али не и интензивна потрошња шећера трајала је до 84 h култивације ( $p < 0,001$ ), након чега је готово стагнирала до 120 h ( $p = 0,135$ ) када је садржај овог нутријента у култивационој течности износио 15,33 g/l. Промена садржаја шећера у осталим медијумима интензивно се одвијала од самог почетка култивације. У медијумима на бази течних ефлуената скупљених приликом прања танкова након бистрења шире флотацијом (слика 5.1. в) и ферментације (слика 5.1. г) интензивна потрошња поменутог нутријента уочена је до 96 h култивације ( $p < 0,001$ ) после чега није била значајна што је доказано  $p$ -вредностима од 0,196 и 0,173, редоследом. По завршетку биосинтезе у добијеним култивационим течностима утврђена је количина шећера од 7,91 g/l и 8,75 g/l, редоследом. У медијуму који је у својој основи садржао отпадну воду од прања пресе (слика 5.1. б) интензивно смањење концентрације шећера забележено је до 84 h култивације ( $p < 0,001$ ). Након овог периода, па до краја култивације потрошња шећера готово да није ни детектована ( $p = 0,384$ ), а његов садржај по завршетку биопроцеса износио је 8,24 g/l.

Поређењем количина шећера које заостају у култивационим течностима по завршетку биосинтезе утврђено је да медијум чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина садржи значајно већу количину овог нутријента ( $p < 0,001$ ) у односу на друге испитиване медијуме између којих не постоји статистички значајна разлика у погледу резидуалног садржаја шећера ( $p = 0,104$ ). Са друге стране, у свим испитиваним медијумима након 96 h култивације не долази до значајне промене концентрације шећерних компоненти. С обзиром да ћелије производног микроорганизма изворе угљеника користе за одржавање енергетских потреба, раст и умножавање, али и за биосинтезу ксантана (Rosalam and England, 2006), јасно је да након наведеног периода не долази до значајне продукције биополимера. На основу наведеног могуће је скратити трајање култивације за 24 h без негативног утицаја на принос жељеног производа.

Према резултатима приказаним на слици 5.1. може се уочити значајна разлика у количини укупног азота у свим медијумима на почетку биопроцеса ( $p < 0,001$ ). Највише азота садржано је у медијуму чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина (616,33 mg/l), значајно мање количине утврђене су у медијумима на бази ефлуената скупљених приликом прања танкова након бистрења шире (413,67 mg/l) и ферментације (323,67 mg/l), док је најмањи садржај овог нутријента



Слика 5.1. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина: а) муљање, б) пресовање, в) флотација, г) ферментација, д) претакање

детектован у медијумима који су у својој основи садржали отпадне токове од прања муљаче (89,28 mg/l) и пресе (103,45 mg/l) између којих једино није утврђено постојање статистички значајне разлике ( $p=0,132$ ). Ако се узме у обзир састав коришћених сировина (табела 5.2), као и начин припреме медијума који је подразумевао само корекцију садржаја шећера, добијени резултати су у складу са очекивањима. Почетни садржај азота у култивационом медијуму нарочито је важан јер од њега зависи правац у ком ће метаболизам производног микроорганизама да се одвија. Наиме, у медијумима са великом количином азота фаворизоваће се раст ћелија, али уколико је та количина превелика доћи ће до инхибиције метаболичке активности што ће се негативно одразити на цео производни поступак (Lo et al., 1997). Са друге стране, успешност биопроцеса у огромној мери зависи и од компоненте медијума која је извор поменутог лимитирајућег нутријента (Rosalam and England, 2006), а доказано је да отпадне воде винарија у зависности од фазе производње у којој настају садрже велики број различитих азотних једињења (Bustamante et al., 2005; Devesa-Rey et al., 2011).

Статистичка анализа добијених резултата показала је да се садржај укупног азота значајно мењао током култивације одабраног производног соја на свим испитиваним медијумима ( $p<0,001$ ) што је јасан показатељ да није дошло до инхибиције његове метаболичке активности. Међутим, неједнака динамика промене упућује на разлике у интензитету ћелијског метаболизма и моментима ступања у одређену фазу раста. С обзиром да се на медијумима чија су основа отпадне воде од прања муљаче (слика 5.1. а) и танка након претакања вина (слика 5.1. д) у првих 12 h култивације, поред садржаја шећера, није значајно мењао ни садржај азота ( $p=0,060$  и  $p=0,392$ , редоследом), јасно је да је по инокулацији наступила фаза прилагођавања. Након наведеног периода уочена је значајна потрошња укупног азота у оба медијума ( $p<0,001$ ) што је показатељ уласка производног микроорганизама у експо-



енцијалну фазу раста. Ова фаза у медијуму на бази ефлуента од прања муљаче трајала је до 60 h култивације, након чега је наступила стационарна фаза што потврђује непромењен садржај азота до 120 h ( $p=0,139$ ) када је износио 49,87 mg/l. У медијуму чија је основа отпадна вода скупљена приликом прања танка након претакања вина од 48 h није уочена значајна промена у садржају укупног азота ( $p=0,061$ ) који је у 120 h култивације износио 483,00 mg/l. Иако се у медијуму који је припремљен са отпадном водом од прања ферментационог танка (слика 5.1. г) садржај шећера интензивно смањивао од почетка биопроцеса, током првих 12 h није уочена значајна потрошња азотних компоненти ( $p=0,089$ ). Након наведеног периода забележено је интензивно смањење количине овог нутријента до 60 h култивације ( $p<0,001$ ) после чега је оно било готово безначајно до краја биопроцеса ( $p=0,179$ ) када је одређен садржај азота од 169,67 mg/l. У медијумима чија су основа отпадни токови од прања пресе (слика 5.1. б) и танка након бистрења шире (слика 5.1. в) концентрација азота се од почетка култивације значајно смањивала до 60 h ( $p<0,001$ ), односно 48 h ( $p<0,001$ ), редоследом, након чега се у оба медијума није приметно мењала до краја биопроцеса ( $p=0,116$  и  $p=0,194$ , редоследом). Резидуални садржаји укупног азота у наведеним медијумима износили су 103,45 mg/l и 223,00 mg/l, редоследом. Статистичком анализом доказано је да се количина азота која заостаје у култивационим течностима по завршетку биопроцеса значајно разликује међу медијумима ( $p<0,001$ ), осим између оних чија су основа отпадне воде од прања муљаче и пресе ( $p=0,718$ ) што је утврђено и анализом узорака непосредно након инокулације.

Будући да је анализа састава сировина показала да отпадне воде из производње белог вина садрже много већу количину укупног азота од асимилабилног (табела 5.2) може се очекивати да је тај однос задржан и у медијумима припремљеним на бази ових ефлуената. Добијени резултати су у складу са очекивањима што потврђују вредности приказане на слици 5.1. Дакле, највећа количина аминок и амонијачног азота одређена је у медијуму који је у својој основи садржао отпадни ток скупљен приликом прања танка након претакања вина (133,00 mg/l), значајно мањи садржај ових компоненти утврђен је у медијумима са ефлуентима од прања танкова по завршетку флотације (90,02 mg/l) и ферментације (84,33 mg/l), док су медијуми на бази отпадних вода са муљаче и пресе садржали најмање асимилабилног азота (22,47 mg/l и 13,07 mg/l, редоследом). Статистичком анализом је утврђено да се садржај лако усвојивог азота није разликовао значајно између медијума који су у својој основи садржали отпадне воде од прања танкова након бистрења шире и ферментације ( $p=0,093$ ), иако је количина укупног азота присутна у овим медијумима међусобно била статистички значајно различита ( $p<0,001$ ). Са друге стране, медијуми чија су основа отпадни токови скупљени приликом прања муљаче и пресе садржали су подједнаке количине укупног, али не и асимилабилног азота ( $p=0,012$ ).

Поређењем добијених резултата и њиховом статистичком обрадом утврђено је да су се динамика промене укупног и асимилабилног азота међусобно разликовале. Наиме, у свим испитиваним медијумима детектовано је значајно смањење садржаја асимилабилног азота од почетка култивације. То је последица много мање количине аминок и амонијачног азота у коришћеним отпадним водама винарија у односу на укупан азот те се значајна потрошња поменутих лако усвојивих азотних компоненти не мора нужно одразити на значајну промену садржаја свих азотних једињења. Међутим, време у ком ћелије улазе у стационарну фазу, односно када престаје интензивно смањење садржаја асимилабилног азота, поклапа се са моментом престанка потрошње укупних азотних компоненти у свим медијумима осим у оном чија је основа отпадна вода скупљена приликом прања ферментационог танка (слика 5.1. г). Код овог медијума интензивна потрошња укупног азота детектована је до 60 h култивације, док се аминок и амонијачни азот значајно трошио само до 48 h ( $p<0,001$ ). Од 48 h до 120 h култивације промена садржаја лако усвојивих азотних једињења у наведеном медијуму није била значајна ( $p=0,060$ ), а по завршетку биопроцеса неискоришћена количина асимилабилног азота износила је 10,23 mg/l. Биопроцесе на медијумима који су у својој основи садржали ефлуенте скупљене током прања танкова након

флотације (слика 5.1. в) и претакања вина (слика 5.1. д) окарактерисало је значајно смањење концентрације амина и амонијачног азота такође до 48 h култивације ( $p < 0,001$ ) након чега промена количине ових компоненти није била значајна ( $p = 0,176$  и  $p = 0,496$ , редоследом). Резидуални садржаји асимилабилног азота у наведеним медијумима износили су 9,21 mg/l и 45,00 mg/l, редоследом. Значајна потрошња асимилабилних азотних једињења у медијумима на бази отпадних вода од прања муљаче (слика 5.1. а) и пресе (слика 5.1. б) трајала је до 60 h ( $p < 0,001$ ). Од овог момента па до краја биопроцеса количина амина и амонијачних компоненти у наведеним медијумима није се значајно мењала што потврђују  $p$ -вредности од 0,090 и 0,069, редоследом. На крају култивације ови медијуми садржали су 5,26 mg/l и 1,88 mg/l асимилабилног азота, редоследом.

Статистичка анализа података који се односе на резидуалне садржаје асимилабилног азота у култивационим медијумима показала је да вредност овог параметра значајно зависи од састава ефлуента коришћеног за његову припрему ( $p < 0,001$ ). Међутим, по завршетку биосинтезе није потврђена статистички значајна разлика у количини амина и амонијачног азота између медијума на бази отпадних вода од прања танкова након бистрења шире и ферментације ( $p = 0,418$ ) што је утврђено и на почетку биопроцеса. Иако се током биосинтезе динамика промене садржаја лако усвојивог азота у овим медијумима међусобно разликовала, одабрани производни сој је у примењеним условима метаболисао подједнаке количине наведених компоненти. Битно је напоменути да се количина утрошених амина и амонијачних једињења за све испитиване медијуме кретала у опсегу од 11,19 mg/l до 88,00 mg/l. Са друге стране, потрошња укупног азота у анализираним медијумима је била приметно већа и налазила се у интервалу од 39,42 mg/l до 223,00 mg/l што указује на то да се у отпадним водама генерисаним током производње белог вина налазе и друге азотне компоненте које одабрани производни сој може да метаболише.

Резултати приказани на слици 5.1. указују да се почетни садржај укупног фосфора значајно разликовао међу медијумима ( $p < 0,001$ ) што је, као и код азота, последица различитог састава коришћених сировина (табела 5.2.) и примењеног начина припреме култивационих медијума. Највише фосфора садржали су медијуми чија су основа отпадни токови скупљени приликом прања танкова након ферментације (64,85 mg/l) и претакања вина (60,82 mg/l), значајно мање количине детектоване су у медијуму на бази отпадне воде од прања танка по завршетку флотације (27,84 mg/l), док је најмањи садржај овог нутријента утврђен у медијумима који су у својој основи садржали ефлуенте прикупљене током прања муљаче (9,04 mg/l) и пресе (8,56 mg/l). Између два последње поменута медијума није доказано постојање статистички значајне разлике у количини укупног фосфора на почетку биопроцеса ( $p = 0,350$ ). Такође, ова два медијума нису се значајно разликовала ни по садржају укупног азота. Фосфор је, као и азот, компонента медијума која директно утиче на раст и размножавање ћелија производног соја, а индиректно и на успешност производње ксантана. Лимитирањем садржаја фосфора у медијуму за биосинтезу постиже се висока ефикасност биопроцеса јер се његовим исцрпљењем успорава умножавање биомасе, а подстиче интензивна продукција биополимера (García-Ochoa et al., 1992). Узимајући ово у обзир може се очекивати да ће се значајне разлике у количинама фосфора, али и азота, у испитиваним медијумима одразити на интензитет биосинтезе ксантана у примењеним условима, док између медијума са подједнаким садржајем ових нутријената не би требало да буде разлике у количини продукованог ксантана, осим ако су извори ових лимитирајућих нутријената различита једињења (Kumara et al., 2012).

Анализом добијених резултата утврђена је значајна потрошња укупног фосфора од самог почетка култивације одабраног производног соја на свим медијумима. Време у којем се фосфор троши у највећој мери поклапа се са периодом интензивног смањења концентрације азота. Ово је примећено код свих медијума осим оних чија су основа ефлуенти скупљени током прања муљаче (слика 5.1. а) и пресе (слика 5.1. б). У овим медијумима значајно смањење садржаја фосфорних

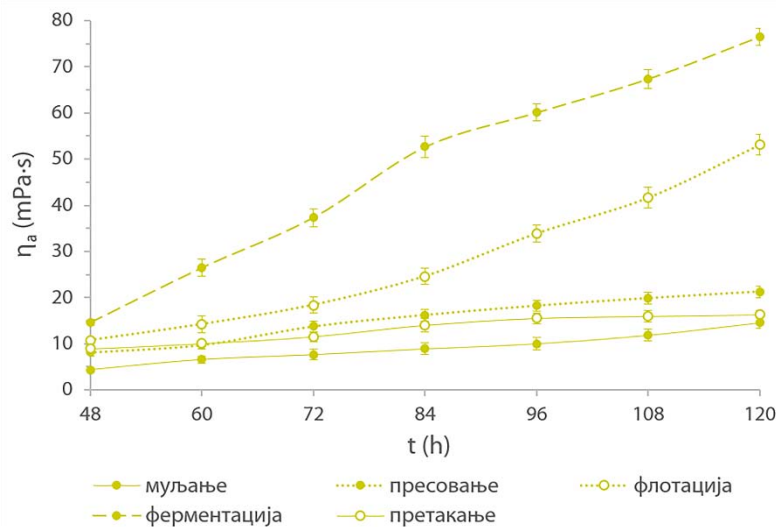
једињења трајало је 12 h краће у односу на период потрошње укупног азота, односно детектовано је до 48 h култивације ( $p < 0,001$ ), након чега је било готово неприметно до 120 h што доказују  $p$ -вредности од 0,085 и 0,097, редоследом. Уочена појава је, вероватно, последица изразито малих количина укупног фосфора детектованих на почетку бисинтезе због чега је производни микроорганизам у наведеном периоду утрошио све фосфорне компоненте које може да метаболише, док је усвојивих азотних једињења у поменутих медијумима очигледно било више. Количина укупног фосфора која је заостала у овим медијумима по завршетку култивације износила је 4,28 mg/l и 3,87 mg/l, редоследом. Интензивно смањење садржаја укупног фосфора до 48 h забележено је и у медијумима на бази отпадних токова генерисаних приликом прања танкова након бистрења шире флотацијом (слика 5.1. в) и претакања вина (слика 5.1. д) после чега промена количине овог нутријента у поменутих медијумима није била значајна до краја биосинтезе што поткрепљују  $p$ -вредности од 0,304 и 0,088, редоследом. Резидуални садржаји укупног фосфора у овим медијумима износили су 8,93 mg/l и 30,82 mg/l, редоследом. У медијуму који је у својој основи садржао отпадну воду од прања ферментационог танка (слика 5.1. г) потрошња фосфора била је интензивна до 60 h култивације ( $p < 0,001$ ) након чега уочена промена није била статистички значајна до 120 h ( $p = 0,147$ ) када је анализирани нутријент детектован у количини од 22,53 mg/l. Статистичком анализом је доказано да се неискоришћена количина укупног фосфора присутна у култивационим течностима по завршетку биопроцеса значајно разликовала међу огледима ( $p < 0,001$ ), осим оних где су за биосинтезу ксантана коришћени медијуми чија су основа отпадне воде од прања муљаче и пресе ( $p = 0,576$ ). Анализа узорака наведених култивационих медијума одмах по инокулацији показала је исте резултате.

На основу промене садржаја најзначајнијих нутријената у медијумима чија су основа отпадне воде из различитих фаза производње белог вина (слика 5.1) потврђено је да се метаболичка активност одабраног производног соја у примењеним условима несметано одвијала. Међутим, да би се утврдило да је у испитиваним ефлуентима осим умножавања биомасе дошло и до продукције ксантана, од момента промене услова вршена су и реолошка мерења. Резултати реолошких одређивања фитовани су степеним законом како би се дефинисали индекс тока и фактор конзистенције. Високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,991$ ) указују на изузетно поклапање мерених вредности са наведеном функционалном зависношћу, а одређене вредности реолошких параметара приказане су у табели 5.5.

Табела 5.5. Реолошке карактеристике медијума чија су основа отпадне воде из производње белог вина током биосинтезе ксантана

t (h)	муљање		пресовање		флотација		ферментација		претакање	
	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )
48	0,7350	0,0162	0,6106	0,0557	0,5412	0,1054	0,4992	0,1768	0,6261	0,0574
60	0,6230	0,0428	0,5710	0,0821	0,4937	0,1770	0,4634	0,3835	0,5706	0,0853
72	0,5487	0,0723	0,5676	0,1181	0,4836	0,2411	0,4321	0,6327	0,5099	0,1327
84	0,4813	0,1162	0,5475	0,1541	0,4634	0,3566	0,4219	0,9383	0,4522	0,2152
96	0,4452	0,1581	0,5356	0,1839	0,4421	0,5461	0,3882	1,2669	0,4317	0,2640
108	0,4316	0,2007	0,5195	0,2173	0,4167	0,7612	0,3702	1,5537	0,4153	0,2945
120	0,3932	0,2987	0,5120	0,2413	0,3784	1,1757	0,3686	1,7795	0,3950	0,3331

Резултати приказани у табели 5.5. указују да су се вредности фактора конзистенције за све медијуме повећавале са временом трајања култивације што је јасан показатељ да долази до промене реологије система. Поред тога, вредности индекса тока од почетка реолошких мерења биле су мање од један чиме је утврђен псеудопластичан тип протицања култивационих течности. С обзиром да су се вредности овог показатеља смањивале до краја биопроцеса псеудопластичан карактер медијума постајао је израженији. Наведене промене несумњива су потврда да је у примењеним условима дошло до биосинтезе ксантана на свим испитиваним отпадним водама из производње белог вина. На основу вредности реолошких параметара изачунати су привидни вискозитети култивационих течности (део 4.6.2), а њихова промена током трајања култивације приказана је на слици 5.2.



Слика 5.2. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа отпадне воде из производње белог вина током биосинтезе ксантана

Статистичком обрадом резултата приказаних на слици 5.2. утврђено је да се привидни вискозитет култивационих медијума на бази отпадних вода које се генеришу у различитим фазама производње белог вина значајно мењао са временом трајања биопроцеса ( $p < 0,001$ ), док различита динамика промене овог параметра упућује на варијације у количини и квалитету ксантана биосинтетисаног на овим ефлуентима. Већ на самом почетку мерења уочене су значајне разлике у привидном вискозитету медијума ( $p < 0,001$ ). У 48 h култивације највискознији су били медијуми који су у својој основи садржали отпадне токове скупљене приликом прања танкова по завршетку бистрења шире флотацијом (10,72 mPa·s) и ферментације (14,58 mPa·s), значајно мањи привидни вискозитети одређени су за медијуме на бази ефлуената насталих приликом прања пресе (8,15 mPa·s) и танка након првог претакања вина (8,91 mPa·s), док је најмање вискозан био медијум са отпадном водом од прања опреме након муљања грожђа (4,31 mPa·s).

Значајно повећање привидног вискозитета од почетка мерења до краја биопроцеса утврђено је код медијума за чију су припрему коришћени ефлуенти генерисани приликом прања муљаче и танкова након флотације и ферментације ( $p < 0,001$ ). Статистички значајан, али не и интензиван пораст привидног вискозитета забележен је на медијуму са отпадном водом од прања муљаче, док је код друга два медијума промена овог параметра била много интензивнија. По завршетку биосинтезе привидни вискозитети наведених медијума износили су 14,60 mPa·s, 53,13 mPa·s и 76,58 mPa·s, редоследом. Важно је напоменути да у овим медијумима након 96 h култивације

потрошња извора угљеника није била значајна што је, како је већ поменуто, јасан показатељ престанка биосинтезе ксантана. Међутим, пошто вискозитет култивационих течности ксантана не зависи само од концентрације биополимера, већ и од његове молекулске масе, као и расподеле пируватних и ацетатних група у молекулу (Reis et al., 2010), очигледно је да је повећање вискозитета медијума након наведеног периода последица промене квалитета биополимера. Наиме, одабрани производни сој у зависности од састава медијума и примењених процесних услова синтетише макромолекуле одређене дужине и структуре који се, захваљујући пируватним и ацетатним групама у молекулу, током трајања биопроцеса умрежавају преко двовалентних јона присутних у култивационој течности. Ово је нарочито изражено у култивационим медијумима у којима се калцијум-карбонат додаје као средство за пуферовање и извор минералних материја (Roseiro et al., 1992). С обзиром да је припрема медијума из оквира ових истраживања подразумевала и додавање поменутог једињења може се претпоставити да су наведене чињенице разлог повећања привидног вискозитета култивационог медијума у периоду када потрошња угљеника, а самим тим и продукција ксантана нису значајни. Привидни вискозитети медијума који су у својој основи садржали отпадне токове скупљене приликом прања пресе и танка након претакања вина у 48 h култивације нису се међусобно значајно разликовали ( $p=0,193$ ). За разлику од претходно поменутих медијума, на овим ефлуентима значајна промена вредности посматраног параметра није утврђена до 60 h ( $p=0,110$  и  $p=0,199$ , редоследом). Након тога, на медијуму са отпадном водом од прања пресе привидни вискозитет се значајно повећавао до 108 h ( $p<0,001$ ) после чега се незнатно мењао до краја култивације ( $p=0,155$ ) када је износио 21,25 mPa·s. Значајан пораст привидног вискозитета медијума на бази ефлуента скупљеног током прања танка након претакања вина забележен је од 60 h до 96 h ( $p<0,001$ ), док са даљим извођењем биопроцеса готово да није ни детектован ( $p=0,387$ ). По завршетку култивације привидни вискозитет овог медијума износио је 16,35 mPa·s, а није се статистички значајно разликовао у односу на привидни вискозитет медијума на бази отпадне воде од прања муљаче ( $p=0,206$ ). Између осталих медијума утврђена је значајна разлика у погледу вредности овог параметра на крају биосинтезе ( $p<0,001$ ). С обзиром да се производња ксантана на свим медијумима одвијала при истим условима уочене разлике последица су искључиво различитог састава коришћених сировина.

На основу привидног вискозитета медијума не може се тачно утврдити на којим фракцијама отпадних вода примењени производни сој продукује више ксантана. Стога су, за тачну процену успешности производње овог биополимера на отпадним токовима из различитих фаза производње белог вина, култивационе течности по завршетку биопроцеса анализирани у погледу количине биосинтетисаног ксантана, а израчунати су и степен конверзије шећера у производ, као и укупне конверзије свих значајних нутријената. Статистички обрађени резултати (део 4.7) представљени су у табели 5.6.

Резултати приказани у поменутој табели указују да успешност биосинтезе ксантана на отпадним водама из производње белог вина у великој мери зависи од порекла сировине. Без обзира што се генеришу у истом производном процесу, отпадне воде из различитих фаза производње карактерише различита концентрација лимитирајућих нутријената, али и загађујућих материја чији се садржај не коригује током припреме култивационих медијума што се у великој мери одражава на ефикасност испитиваног биопроцеса (López et al., 2001). Најмања продукција ксантана остварена је на медијумима који су садржали отпадне воде од прања муљаче (4,00 g/l) и танка након претакања вина (4,04 g/l). Ако се узме у обзир да су поменути медијуми по завршетку биопроцеса били најмање вискозни (слика 5.2) добијени резултати су у складу са очекивањима. Као и у погледу привидног вискозитета, ове култивационе течности нису се статистички значајно разликовале ни у погледу количине биосинтетисаног ксантана ( $p=0,900$ ). Значајно веће количине биополимера издвојене су из медијума на бази ефлуената скупљених током прања пресе (7,60 g/l)

и ферментационог танка (7,49 g/l). Иако су се ова два медијума значајно разликовала у погледу привидног вискозитета (слика 5.2.), према садржају биосинтетисаног ксантана није утврђена значајна разлика међу њима ( $p=0,730$ ) што је јасан показатељ да су биополимери продуктовани на овим медијумима веома различитог квалитета. Према резултатима реолошких мерења очекивано је да ће отпадна вода која заостаје приликом прања ферментационог танка да садржи највише ксантана (слика 5.2.). Међутим, по издвајању производа утврђено је да је велики привидни вискозитет овог медијума последица продукције ксантана изузетних реолошких карактеристика које нису у истој мери изражене код биополимера синтетисаних на другим медијумима. Иако лошијег квалитета, одабрани производни сој је на отпадном току који се генерише приликом прања танка након бистрења шире флотацијом продуковао највише ксантана. Из овог медијума по завршетку биопроцеса извдојен је ксантан у количини од 10,67 g/l.

Табела 5.6. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина

Отпадна вода	P (g/l)*	K <sub>P/S</sub> (%)*	K <sub>S</sub> (%)*	K <sub>N</sub> (%)*	K <sub>P</sub> (%)*
муљање	4,00±0,30 <sup>a</sup>	15,88±1,27 <sup>a</sup>	62,74±1,25 <sup>b</sup>	44,14±2,89 <sup>b</sup>	52,68±1,25 <sup>ab</sup>
пресовање	7,60±0,24 <sup>b</sup>	30,23±0,90 <sup>b</sup>	67,21±2,66 <sup>bc</sup>	48,84±0,88 <sup>c</sup>	54,82±3,19 <sup>b</sup>
флотација	10,67±0,43 <sup>c</sup>	42,16±1,63 <sup>c</sup>	68,74±1,40 <sup>c</sup>	53,92±2,01 <sup>d</sup>	67,98±3,96 <sup>c</sup>
ферментација	7,49±0,49 <sup>b</sup>	30,12±2,36 <sup>b</sup>	64,82±3,98 <sup>bc</sup>	52,42±2,27 <sup>d</sup>	65,25±2,23 <sup>c</sup>
претакање	4,04±0,35 <sup>a</sup>	16,00±1,58 <sup>a</sup>	40,24±2,93 <sup>a</sup>	21,64±0,19 <sup>a</sup>	49,33±0,28 <sup>a</sup>

\* Вредности у једној колони обележене истим словима налазе се на истом нивоу значајности у интервалу поверења од 95% (Данканов тест вишеструких поређења).

С обзиром да су истраживања из оквира ове докторске дисертације прва која се односе на производњу ксантана на отпадним водама винарија (Bajić et al., 2015; Rončević et al., 2015b; Miljić et al., 2015) веома је тешко добијене резултате поредити са резултатима других аутора, а посебно због тога што успешност овог биопроцеса не зависи само од састава култивационог медијума већ и од примењеног производног соја и процесних услова (de Sousa Costa et al., 2014). Међутим, како се испитивање могућности производње ксантана на различитим отпадним токовима врши у циљу проналазак економичног супстрата који ће се користити као погодна замена за стандардну полусинтетичку подлогу са глукозом, резултати најуспешнијег огледа из ове фазе истраживања упоређени су са резултатима биосинтезе ксантана на поменутој подлози. Сој *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, који је коришћен као производни микроорганизам и у оквиру ових испитивања, на традиционално примењиваној подлози са 20 g/l глукозе продуковао је ксантан у количини од 13,24 g/l (Bajić et al., 2015b) што је за око 20% више у односу на количину ксантана коју је отпадна вода од прања танка након бистрења шире флотацијом садржала по завршетку биопроцеса. Као алтернативни супстрат за производњу ксантана најбоље се показала меласа шећерне репе која је доступна и на нашем тржишту. Из медијума са меласом у којој је почетна концентрација извора угљеника подешена на 30 g/l након успешно изведене биосинтезе издвојено је 17,10 g/l ксантана (Gilani et al., 2011b). У поређењу са отпадном водом из производње белог вина која је селектована као најефикаснија, на меласи је могуће произвети ксантан у количини већој за скоро 40%. И друге сировине показале су се као веома погодне за производњу ксантана, а од испитиваног агроиндустријског отпада посебно интересантни за поређење са резултатима из оквира ових истраживања су некавалитетан сок од грожђа, због састава сличног отпадним водама винарија, екстракт дателе, јер од извора угљеника садржи глукозу и фруктозу у еквимоларним количинама, и отпадна вода из производње маслиновог уља, карактеристична по

високом садржају фенолних једињења. На култивационим медијумима са соком од грожђа и екстрактом датуне у којима је иницијални садржај извора угљеника подешен на 40 g/l одабрани производни сој продуковао је ксантан у количини од 14,35 g/l (Ghashghaei et al., 2016) и 11,20 g/l (Khosravi-Darani et al., 2011), редоследом. Имајући у виду да су ови медијуми у односу на медијум са отпадним током који се генерише током прања танка након флотације садржали готово 40% више угљеника, разлика у количини биосинтетисаног ксантана од 25% и 5% није толико значајна. Култивација референтног соја на ефлуентима индустрије маслиновог уља са истим садржајем извора угљеника као у претходно поменутих медијумима није била толико успешна. По завршетку биопроцеса добијена култивациона течност садржала је само 7,71 g/l ксантана (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996), што је за готово 30% мање у односу на отпадну воду из производње белог вина која се у овим истраживањима показала као најбоља.

Осим постизања високих концентрација жељеног биопроизвода, успешност биотехнолошке производње мери се и према степену искоришћења супстрата. Остварене вредности конверзије извора угљеника у ксантан приказане у табели 5.6. налазиле су се у опсегу од 15,88% до 42,16%. С обзиром да је почетни садржај шећера у свим испитиваним медијумима био готово идентичан (слика 5.1.) јасно је да је највећи степен конверзије супстрата у производ остварен у медијуму са највећом количином биосинтетисаног ксантана. Такође, медијуми који се нису међусобно значајно разликовали по садржају биополимера нису окарактерисани ни по значајно различитом степену конверзије шећера у ксантан ( $p=0,932$  за отпадне воде од прања муљаче и танка након претакања вина, односно  $p=0,937$  за ефлуенте генерисане прањем пресе и ферментационог танка). Литературни наводи упућују да се у индустријским условима за око 100 h култивације бар 50% глукозе из подлоге конвертује у ксантан (Palaniraj and Jayaraman, 2011) што у примењеним условима није остварено ни у једном испитиваном медијуму.

Укупна конверзија извора угљеника је веома важан параметар биотехнолошке производње јер неискоришћени нутријенти, нарочито код медијума који се обогаћују чистим хемикалијама, представљају губитке у економском смислу, а отпадне воде које се потом генеришу носе значајно органско оптерећење те морају да прођу захтеван поступак обраде пре него што се испусте у животну средину што додатно поскупљује производни процес (Kurbanoglu and Kurbanoglu, 2007). Поред тога, ако се упореде вредности степена конверзије шећерних компоненти у ксантан са укупном конверзијом овог нутријента може се утврдити која количина извора угљеника се троши на умножавање биомасе и биосинтезу споредних метаболита, а која на продукцију биополимера. Резултати приказани у табели 5.6. указују да је највећа конверзија угљеника (68,74%) остварена на медијуму који је по завршетку култивације садржао и највећу количину биосинтетисаног ксантана. Међутим између ове вредности и вредности истог параметра за медијуме на бази отпадних вода од прања пресе (67,21%) и ферментационог танка (64,82%) не постоји статистички значајна разлика што потврђују  $p$ -вредности од 0,497 и 0,114, редоследом. Како је одабрани производни сој на овим медијумима продуковао много мање ксантана евидентно је да њихов састав није једнако погодан за синтезу жељеног биополимера. Такође, између медијума са најмањом количином ксантана утврђена је значајна разлика у погледу укупне конверзије шећера ( $p<0,001$ ). Имајући у виду да је у медијуму чија је основа ефлуент скупљен приликом прања муљаче конвертовано чак 62,74% шећера, што се не разликује значајно у односу на остварене конверзије у отпадним токовима од прања пресе ( $p=0,076$ ) и ферментационог танка ( $p=0,358$ ) у којима је садржај ксантана био много већи, утврђено је да се након муљања грожђа у производњи белог вина генеришу ефлуенти веома погодни за умножавање биомасе и/или биосинтезу других продуката ћелијског метаболизма. Са друге стране, не тако интензивна потрошња нутријената (слика 5.1. д), веома ниска вредност укупне конверзије шећера (40,24%), као и изузетно мала количина ксантана биосинтетисаног на отпадној води од прања танка након претакања вина упућују да је на овом медијуму метаболичка активност производног соја делимично инхибирана.

Ово може бити последица присуства веће количине укупних фенола у односу на остале испитиване отпадне токове (табела 5.2.), али и неких других супстанци које делују инхибиторно на метаболизам примењене бактеријске културе.

Како би се обезбедила економски и еколошки прихватљива производња у обзир се морају узети и вредности конверзије других значајних нутријената, попут укупног азота и фосфора. Резултати дати у табели 5.6. показују да су се вредности наведених параметара значајно разликовале међу испитиваним медијумима ( $p < 0,001$ ). Конверзија укупног азота се кретала од 21,64% до 44,14%, док је конверзија укупног фосфора била у интервалу од 49,33% до 67,98%. Интересантно је споменути да је највећа конверзија азота остварена је на истом медијуму за који је и конверзија фосфора највећа што је примећено све до најнижих вредности. Значајно мање конверзије оба нутријента за медијум са отпадном водом од прања танка након претакања вина у односу на остале медијуме додатни су показатељи могућег инхибиторног деловања фенолних једињења или неких других компоненти које поменути ефлуент садржи.

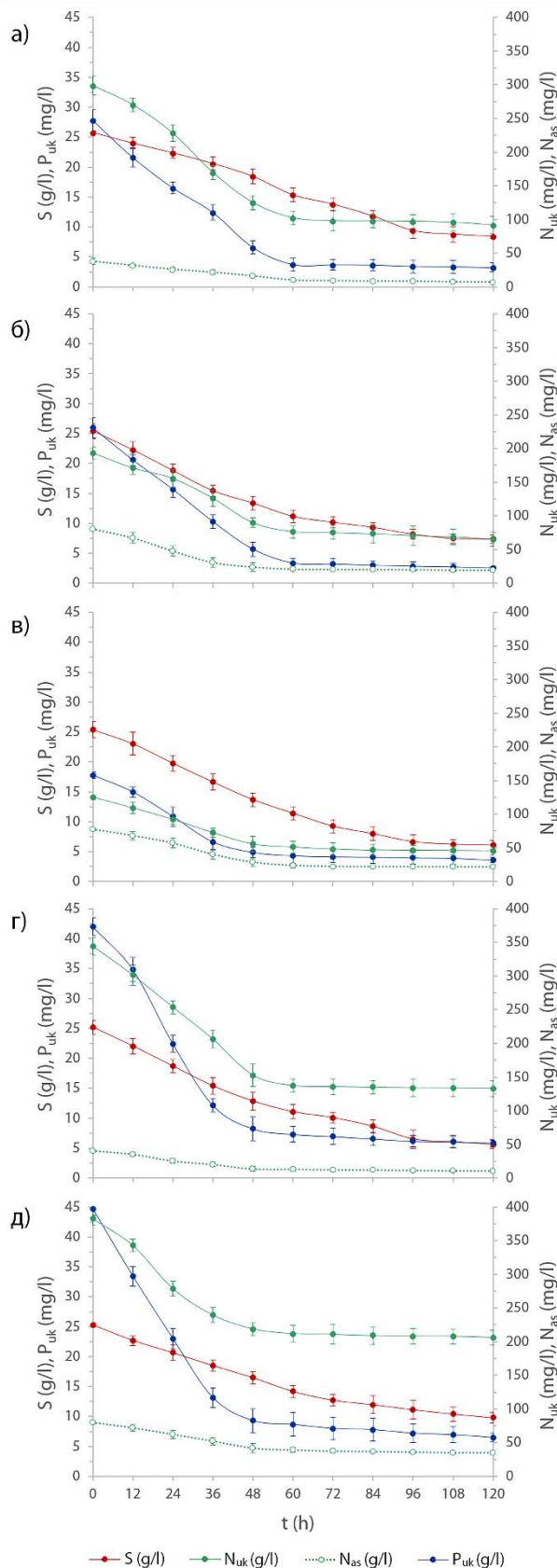
Иако је експериментално потврђена могућност производње ксантана на свим испитиваним течним ефлуентима који се генеришу у производњи белог вина, анализом добијених резултата утврђено је да је највећа успешност биопроцеса остварена на отпадној води од прања танка након бистрења шире флотацијом. Без обзира што се на овом медијуму продукује мања количина биополимера него на стандардној полусинтетичкој подлози са глукозом и другим сличним агроиндустријским ефлуентима, овај отпадни ток индустрије вина има велики потенцијал за примену у биотехнолошкој производњи ксантана. То потврђују његова изузетна нутритивна вредност и релативно једноставан начин припреме медијума који подразумева центрифугирање, разблаживање, додаток средства за пуферовање, корекцију вредности рН и стерилизацију.

### 5.3.1.2. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих фаза производње розе вина

На слици 5.3. (а-д) приказана је промена садржаја шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на медијумима који су у својој основи садржали отпадне воде из производње розе вина скупљене приликом прања муљаче, пресе и танкова након бистрења шире таложењем, ферментације и првог претакања вина, редоследом.

Резултати приказани на поменутој слици и њихова статистичка обрада показују да се садржај шећера у свим медијумима на бази отпадних вода из различитих фаза производње розе вина интензивно смањивао од самог почетка биопроцеса. Ово се разликује од претходних истраживања где је утврђено да метаболичка активност одабраног производног соја није на свим ефлуентима индустрије белог вина значајно изражена одмах по инокулацији (слика 5.1). У медијумима на бази отпадних токова скупљених приликом прања муљаче (слика 5.3. а), пресе (слика 5.3. б) и танкова након ферментације (слика 5.3. г) и претакања вина (слика 5.3. д) интензивна потрошња шећера забележена је до 96 h култивације ( $p < 0,001$ ) после чега ни у једном од испитиваних медијума наведена промена није била значајна што потврђују  $p$ -вредности од 0,294, 0,351, 0,388 и 0,168, редоследом. Резидуални садржаји шећера у култивационим течностима по завршетку биосинтезе ксантана на наведеним сировинама износили су 8,43 g/l, 7,35 g/l, 5,61 g/l и 9,80 g/l, редоследом. У медијуму који је у својој основи садржао отпадну воду од прања танка после бистрења шире таложењем (слика 5.3. в) значајно смањење садржаја анализираног нутријента трајало је нешто краће, односно до 84 h ( $p < 0,001$ ). Након овог периода па до краја култивације потрошња шећера готово да није ни детектована ( $p = 0,100$ ), а количина која је по завршетку биопроцеса одређена у медијуму износила је 6,10 g/l.





Слика 5.3. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина: а) муљање, б) пресовање, в) таложење, г) ферментација, д) претакање

Иако се испитивани медијуми на почетку биосинтезе нису разликовали у погледу количине редукујућих шећера ( $p=0,956$ ), значајно различити садржаји овог нутријента у култивационим течностима по завршетку биопроцеса ( $p<0,001$ ) резултат су метаболичке активности одабраног производног соја у присуству различитих концентрација осталих важних нутријената (табела 5.3.) чији садржај није коригован током припреме медијума. Утврђено је да се производњом ксантана на медијуму чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина добијају култивационе течности у којима је резидуални садржај шећера значајно већи у односу на друге испитиване медијуме ( $p<0,039$ ). Међутим, количина шећера која заостаје у медијумима на бази отпадних вода из производње розе вина мања је у односу садржај истог нутријента у ефлуентима индустрије белог вина по завршетку биосинтезе ксантана. Ово може бити резултат интензивне потрошње шећерних компоненти у медијумима чија су основа отпадни токови индустрије розе вина одмах по инокулацији. Ипак, значајна промена садржаја редукујућих шећера у култивационим медијумима из ових огледа, као и у претходној фази истраживања, трајала је до 96 h култивације због чега би дуже извођење биопроцеса било економски неоправдано.

На основу графички приказаних резултата (слика 5.3) може се уочити значајна разлика у количини укупног азота у свим култивационим течностима на почетку биосинтезе ( $p<0,001$ ) што је последица усвојеног начина припреме медијума. Стога је разумљиво зашто почетни садржај поменутог нутријента у испитиваним медијумима зависи од порекла, а самим тим и састава ефлуената (табела 5.3) употребљених за њихову припрему. Највише азотних компоненти садржано је у медијуму чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина (382,67 mg/l), значајно мање количине азота утврђене су у медијумима на бази ефлуената скупљених приликом прања ферментационог танка (344,33 mg/l) и муља-

че (299,00 mg/l), док је најмањи садржај азотних једињења детектован у медијумима који су у својој основи садржали отпадне токове од прања пресе (193,33 mg/l) и танка након бистрења шире таложењем (103,45 mg/l).

Статистичком обрадом добијених резултата утврђено је да се садржај укупних азотних компоненти значајно мењао током трајања култивације одабраног производног соја на свим испитиваним медијумима ( $p < 0,001$ ). С обзиром да је потрошња овог нутријента била интензивна од почетка биосинтезе јасно је да је непосредно по инокулацији наступила експоненцијална фаза раста. У претходном сету експеримената доказано је да изостанак фазе прилагођавања резултује умножавањем биомасе од почетка култивације, а самим тим и бржим достизањем стационарне фазе раста што води ка успешнијој биосинтези ксантана. Експоненцијална фаза у медијумима чија су основа отпадне воде од прања танкова након бистрења шире таложењем (слика 5.3. в), ферментације (слика 5.3. г) и првог претакања вина (слика 5.3. д) трајала је до 48 h јер од овог момента па до краја култивације није уочена значајна промена у садржају укупног азота ( $p = 0,187$ ,  $p = 0,108$  и  $p = 0,244$ , редоследом) који је у 120 h износио 45,60 mg/l, 133,00 mg/l и 206,00 mg/l, редоследом. У медијумима на бази ефлуената који је генеришу током прања муљаче (слика 5.3. а) и пресе (слика 5.3. б) концентрација азота се значајно смањивала до 60 h култивације ( $p < 0,001$ ) након чега се није значајно мењала до краја биопроееса ( $p = 0,339$  и  $p = 0,283$ , редоследом). Резидуални садржаји укупног азота у наведеним медијумима износили су 91,67 mg/l и 65,00 mg/l, редоследом. Применом статистичких тестова доказано је да се количина азота која заостаје у култивационим течностима по завршетку биопроееса значајно разликује међу медијумима ( $p < 0,001$ ), али не и између оних чија су основа отпадне воде од прања пресе и танка након бистрења шире таложењем ( $p = 0,052$ ). Иако је анализа узорака одмах по инокулацији показала да је медијум са отпадном водом од прања пресе значајно богатији азотним компонентама ( $p < 0,001$ ), дужи период интензивне потрошње овог нутријента могао би бити разлог зашто по завршетку култивације није утврђена разлика у погледу садржаја укупних азотних једињења међу наведеним медијумима.

Значајно различит садржај асимилабилног азота међу медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина на почетку култивације ( $p < 0,001$ ) последица је различитог састава коришћених сировина (табела 5.3). Интересантно је приметити да су ови медијуми, за разлику од претходно испитиваних, садржали веома различите односе укупног и асимилабилног азота што је и карактеристика коришћених ефлуената. Тако су медијуми са отпадним водама од прања муљаче и ферментационог танка садржали веома велике количине укупних азотних једињења, али и најмање количине аминокиселина и амонијачних компоненти (37,77 mg/l и 40,51 mg/l, редоследом) између којих није било значајно велике разлике ( $p = 0,178$ ). Међутим, у медијумима који су у својој основи садржали отпадне токове скупљене приликом прања пресе и танкова након бистрења шире таложењем и претакања вина детектоване су значајно веће количине лако усвојивог азота (80,43 mg/l, 77,43 mg/l и 80,03 mg/l, редоследом) које се међусобно нису статистички значајно разликовале ( $p = 0,161$ ,  $p = 0,837$  и  $p = 0,200$ , редоследом).

Упоређивањем приказаних резултата (слика 5.3) и њиховом статистичком анализом доказано је да се динамика промене укупног и асимилабилног азота у великој мери поклапају. Дакле, у свим испитиваним медијумима детектовано је значајно смањење садржаја асимилабилног азота од самог почетка култивације, а време у ком ћелије улазе у стационарну фазу, односно када престаје потрошња ових азотних компоненти, поклапа се са моментом престанка потрошње укупног азота у свим медијумима, осим у оном чија је основа отпадна вода од прања пресе (слика 5.3. б). Код овог медијума значајна потрошња свих азотних једињења уочена је до 60 h култивације, док се аминокиселина и амонијачни азот интензивно трошио до 48 h ( $p < 0,001$ ). Од 48 h до 120 h култивације промена садржаја асимилабилног азота у поменутом медијуму није била статистички значајна ( $p = 0,261$ ), а по завршетку биопроееса неискоришћена количина лако усвојивих азотних

једињења износила је 19,37 mg/l. Медијуме на бази течних ефлуената насталих приликом прања танкова након бистрења шире таложењем (слика 5.3. в), ферментације (слика 5.3. г) и претакања вина (слика 5.3. д) такође карактерише значајно смањење концентрације аминокиселина и амонијачног азота до 48 h култивације ( $p < 0,001$ ) након чега промена количине ових компоненти није била значајна ( $p = 0,082$ ,  $p = 0,226$  и  $p = 0,077$ , редоследом). Резидуални садржаји асимилабилног азота у наведеним медијумима износили су 21,73 mg/l, 10,57 mg/l и 34,93 mg/l, редоследом. Значајна промена садржаја лако усвојивих азотних једињења у медијуму који је у својој основи садржао отпадни ток са муљаче (слика 5.3. а) трајала је до 60 h култивације ( $p < 0,001$ ). Од овог момента па до краја биопроцеса количина асимилабилног азота у испитиваном медијуму није се значајно мењала што доказује  $p$ -вредност од 0,164. По завршетку биосинтезе добијена култивациона течност садржала је 7,60 mg/l аминокиселина и амонијачног азота.

Статистичким поређењем података који се односе на резидуални садржај асимилабилног азота утврђено је да се вредност овог параметра значајно разликује међу медијумима ( $p < 0,001$ ). Иако су се према веома сличном садржају аминокиселина и амонијачног азота на почетку култивације формирале две групе медијума, по завршеној биосинтези статистички значајна разлика у количини ових азотних компоненти није потврђена једино између оних медијума чија су основа отпадни токови скупљени приликом прања пресе и танка након бистрења шире таложењем ( $p = 0,067$ ). Без обзира на готово идентичну динамику потрошње лако усвојивих азотних једињења од стране одабраног производног соја, добијени резултати последица су евидентних разлика у укупној количини метаболираних аминокиселина и амонијачних компоненти до чега је довело присуство осталих састојака медијума чији садржај, такође, није униформисан. Значајно је истаћи да се и у медијумима на бази отпадних вода које генерише индустрија розе вина током биосинтезе ксантана утроши значајно мање асимилабилног азота (од 29,94 mg/l до 61,07 mg/l) од укупног (79,59 mg/l до 211,33 mg/l) што је доказ да се и у овим ефлуентима налазе додатне азотне компоненте које одабрани производни сој у примењеним условима може да метаболише.

Резултати приказани на слици 5.3. и њихова статистичка обрада показују да се почетни садржај укупног фосфора значајно разликовао међу медијумима ( $p < 0,001$ ) што је, као и код азота, последица различитог састава коришћених сировина (табела 5.3) и примењеног начина њихове припреме. Највише фосфора детектовано је у медијумима који су у својој основи садржали отпадне воде генерисане приликом прања танкова након ферментације (41,97 mg/l) и претакања вина (44,68 mg/l), значајно мање количине одређене су у медијумима на бази отпадних токова од прања муљаче (27,80 mg/l) и пресе (25,96 mg/l), док је најмањи садржај овог нутријента садржао медијум чија је основа течни ефлуент скупљен током прања танка по завршетку бистрења шире таложењем (17,75 mg/l). Само између медијума са средњим садржајем фосфора није утврђена статистички значајна разлика у погледу количине овог лимитирајућег нутријента ( $p = 0,134$ ).

Применом статистичких техника за анализу експерименталних резултата утврђена је значајна промена садржаја укупног фосфора од самог почетка култивације одабраног производног соја на свим медијумима. Такође, доказано је да се периоди интензивне потрошње фосфора и укупног азота у потпуности поклапају. Дакле, значајно смањење количине укупног фосфора до 48 h ( $p < 0,001$ ) забележено је у медијумима на бази отпадних токова насталих приликом прања танкова после бистрења шире (слика 5.3. в), ферментације (слика 5.3. г) и претакања вина (слика 5.3. д) након чега уочена промена није била значајна до краја биопроцеса што потврђују  $p$ -вредности од 0,200, 0,075 и 0,077, редоследом. Резидуални садржаји фосфора у наведеним медијумима износили су 3,59 mg/l, 5,87 mg/l и 6,48 mg/l, редоследом. У медијумима чија су основа отпадне воде од прања муљаче (слика 5.3. а) и пресе (слика 5.3. б) смањење садржаја укупног фосфора интензивно се одвијало до 60 h култивације ( $p < 0,001$ ) после чега није било статистички значајно до 120 h ( $p = 0,639$  и  $p = 0,414$ , редоследом) када су детектоване количине овог нутријента износиле 3,21 mg/l

и 2,55 mg/l, редоследом. Анализом добијених резултата утврђено је да се на основу количине фосфора која заостаје у култивационим течностима формирају две групе медијума унутар којих не постоји статистички значајна разлика у погледу посматраног параметра. Прву групу чине медијуми који у својој основи садрже отпадне воде од прања муљаче, пресе и танка након бистрења шире ( $p=0,189$ ,  $p=0,449$  и  $p=0,062$ ) док у другу групу спадају медијуми на бази ефлуената генерисаних током прања танкова по завршетку ферментације и претакања вина ( $p=0,222$ ).

На основу промене садржаја најзначајнијих нутријената у медијумима чија су основа отпадне воде генерисане током различитих фаза производње розе вина (слика 5.3) доказано је да ни у једном од њих није изражен инхибиторни ефекат ометајућих фактора због чега се метаболизам производног микроорганизма несметано освијао. Ипак, да би се утврдило да је култивација референтног соја резултирала биосинтезом ксантана, од промене вредности процесних параметара вршена су и реолошка мерења узорка култивационих течности. Добијени резултати фитовани су степеним законом, а одређене вредности реолошких параметара, односно индекса тока и фактора конзистенције, приказане су у табели 5.7. Веома високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,990$ ) указују на адекватно фитовање мерених вредности жељеним моделом.

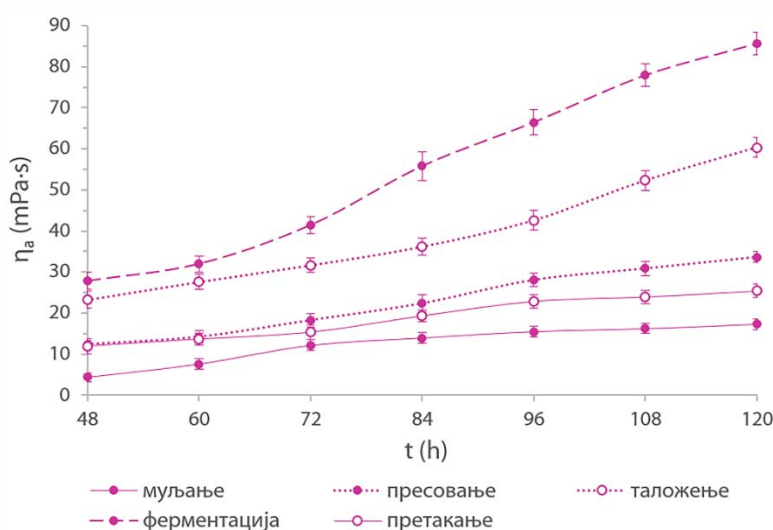
Табела 5.7. Реолошке карактеристике медијума чија су основа отпадне воде из производње розе вина током биосинтезе ксантана

t (h)	муљање		пресовање		флотација		ферментација		претакање	
	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )
48	0,7429	0,0156	0,6075	0,0873	0,5323	0,2389	0,3932	0,5712	0,6010	0,0870
60	0,5510	0,0708	0,5815	0,1139	0,5204	0,3010	0,3839	0,6883	0,5805	0,1101
72	0,6011	0,0884	0,5309	0,1885	0,5045	0,3734	0,3731	0,9411	0,5661	0,1328
84	0,5312	0,1442	0,5360	0,2252	0,4610	0,5303	0,3667	1,3090	0,5426	0,1883
96	0,5192	0,1699	0,5235	0,3010	0,4373	0,7026	0,3881	1,4019	0,5332	0,2337
108	0,5095	0,1866	0,5197	0,3373	0,4350	0,8726	0,3838	1,6792	0,4897	0,3041
120	0,5020	0,2066	0,5071	0,3919	0,4089	1,1465	0,3793	1,8872	0,4825	0,3342

Резултати приказани у табели 5.7. показују да су се вредности фактора конзистенције за све медијуме повећавале са временом трајања култивације што је јасан показатељ да долази до промене реолошког понашања система. Поред тога, индекс тока од почетка реолошких одређивања имао је вредности мање од један чиме је утврђен псеудопластичан тип протикања већ у 48 h култивације. С обзиром да се вредности овог показатеља смањују до краја извођења производног поступка указују на све израженији псеудопластични карактер култивационих течности. Наведене промене сигурна су потврда да је одабрани производни сој у примењеним условима на свим испитиваним отпадним водама из производње розе вина продуковао ксантан. На основу вредности реолошких параметара израчунати су привидни вискозитети медијума на бази отпадних вода пореклом из индустрије розе вина (део 4.6.2) чија је промена током трајања култивације приказана на слици 5.4.

Анализом резултата приказаних на поменутој слици и њиховом статистичком обрадом утврђено је да се привидни вискозитет медијума припремљених са течним ефлуентима из производње розе вина значајно мењао током извођења биопроцеса ( $p < 0,001$ ). Стога се на основу динамике и интензитета промене овог параметра могу наслутити разлике у количини и квалитету ксантана

биосинтетисаног на испитиваним медијумима. Значајне разлике у привидном вискозитету анализираних узорак детектоване су већ од почетка реолошких мерења ( $p < 0,001$ ). Након 48 h култивације највискознији су били медијуми који су у својој основи садржали отпадне токове скупљене приликом прања танкова после бистрења шире (23,24 mPa·s) и ферментације (27,79 mPa·s), значајно мањи привидни вискозитет одређен је за медијуме на бази ефлуената од прања пресе (12,35 mPa·s) и танка након претакања вина (11,92 mPa·s), док је најмање вискозан био медијум са отпадном водом од прања муљаче (4,33 mPa·s). Ако се добијене вредности упореде са привидним вискозитетима отпадних токова из производње белог вина измереним у истом тренутку, може се уочити да су сви ефлуенти индустрије розе вина, изузев отпадне воде са муљаче, били приметно вискознији.



Слика 5.4. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа отпадне воде из производње розе вина током биосинтезе ксантана

Привидни вискозитети медијума који су у својој основи садржали отпадне токове генерисане приликом прања пресе и танка након претакања вина у 48 h култивације нису се међусобно значајно разликовали ( $p=0,759$ ). Такође, примећена је и делимично слична динамика промене овог параметра током извођења биосинтезе на наведеним ефлуентима. У периоду од 48 h до 60 h није уочена значајна промена вредности привидног вискозитета испитиваних медијума ( $p=0,194$  и  $p=0,226$ , редоследом), док је са даљим извођењем култивације забележено нешто интензивније повећање. Привидни вискозитет медијума са отпадном водом од прања пресе се значајно повећавао до 108 h ( $p < 0,001$ ) након чега се незнатно мењао до краја биопроцеса ( $p=0,053$ ) када је износио 33,62 mPa·s. Значајан пораст привидног вискозитета медијума на бази ефлуента скупљеног током прања танка након претакања вина примећен је до 96 h култивације ( $p < 0,001$ ), док са даљим извођењем биосинтезе готово да није ни детектован ( $p=0,094$ ). По завршетку култивације привидни вискозитет овог медијума износио је 25,37 mPa·s. Не тако значајне промене привидног вискозитета у периоду од 48 h до 60 h уочене су и код медијума чија је основа отпадна вода од прања ферментационог танка ( $p=0,075$ ). Након наведеног периода забележено је веома интензивно повећање вредности овог параметра до 120 h када је привидни вискозитет анализираних култивационих течности износио 85,66 mPa·s. Значајно повећање привидног вискозитета од почетка мерења утврђено је код медијума за чију су припрему коришћени ефлуенти настали током прања муљаче и танка након бистрења шире. Привидни вискозитет медијума са отпадном водом од прања танка по завршеном бистрењу шире повећавао се до краја биопроцеса истим

интезитетом ( $p < 0,001$ ) до вредности од 60,31 mPa·s. Према доступним литературним подацима, повећање вискозитета култивационог медијума у периоду када потрошња извора угљеника није значајна може се приписати умрежавању биосинтетисаних макромолекула и формирању агрегата (García-Ochoa et al., 2000). Код медијума са отпадним током од прања муљаче забележено је статистички значајно ( $p < 0,001$ ), али и најмање интензивно повећање вредности посматраног параметра које је трајало до 96 h култивације након чега готово да није ни уочено до 120 h ( $p = 0,315$ ) када је привидни вискозитет добијене култивационе течности износио 17,28 mPa·s. По завршетку биопроцеса привидни вискозитети испитиваних медијума су се међусобно значајно разликовали ( $p < 0,001$ ). Како се биосинтеза ксантана на свим медијумима одвијала при идентичним условима применом истог производног соја уочене разлике последица су искључиво различитог састава коришћених сировина.

Будући да се на основу вредности привидног вискозитета не може тачно проценити успешност биосинтезе ксантана на отпадним токовима из различитих фаза производње розе вина, добијене култивационе течности анализирани су у погледу количине продукованог биополимера, а одређени су и степен конверзије шећера у жељени производ, као и укупне конверзије свих значајних нутријената. Статистички обрађени резултати (део 4.7) приказани су у табели 5.8.

Табела 5.8. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина

Отпадна вода	P (g/l)*	K <sub>P/S</sub> (%)*	K <sub>S</sub> (%)*	K <sub>N</sub> (%)*	K <sub>P</sub> (%)*
муљање	8,11±0,37 <sup>a</sup>	31,46±1,23 <sup>a</sup>	67,28±1,77 <sup>b</sup>	69,43±2,97 <sup>c</sup>	88,52±2,04 <sup>cd</sup>
пресовање	9,35±0,52 <sup>b</sup>	36,77±0,31 <sup>b</sup>	71,15±1,52 <sup>b</sup>	66,50±3,95 <sup>bc</sup>	90,18±0,77 <sup>d</sup>
флотација	14,85±0,81 <sup>d</sup>	58,57±0,39 <sup>d</sup>	75,94±2,41 <sup>c</sup>	63,59±4,45 <sup>bc</sup>	79,82±2,23 <sup>a</sup>
ферментација	17,66±0,63 <sup>e</sup>	70,16±0,96 <sup>e</sup>	77,78±1,99 <sup>c</sup>	61,38±3,08 <sup>b</sup>	86,04±0,94 <sup>bc</sup>
претакање	11,39±0,47 <sup>c</sup>	45,02±1,21 <sup>c</sup>	61,23±3,81 <sup>a</sup>	46,19±1,56 <sup>a</sup>	85,51±1,31 <sup>b</sup>

\* Вредности у једној колони обележене истим словима налазе се на истом нивоу значајности у интервалу поверења од 95% (Данканов тест вишеструких поређења).

Резултати приказани у табели 5.8. потврђују претходно утврђене чињенице да успешност биосинтезе ксантана на индустријским ефлуентима у великој мери зависи од фазе производног поступка у ком се анализирани отпадни ток генерише (López et al., 2001). Статистичком анализом резултата који се односе на количину издвојеног ксантана утврђено је да су култивационе течности на бази отпадних токова индустрије розе вина по завршетку биопроцеса биле значајно различите у погледу садржаја овог биополимера ( $p < 0,001$ ). Најмање ксантана издвојено је из отпадне воде од прања муљаче (8,11 g/l) која је уједно била и најмање вискозна (слика 5.4.). Медијуми на бази отпадних токова скупљених приликом прања пресе и танка након претакања вина на крају култивације садржали су 9,35 g/l и 11,39 g/l ксантана, редоследом. С обзиром да је отпадна вода од прања пресе у тренутку издвајања ксантана била значајно вискознија од другог наведеног медијума ( $p < 0,001$ ), јасно је да се на овој сировини продукује ксантан бољих реолошких карактеристика. Поред тога, треба напоменути да биополимер издвојен из медијума на бази отпадне воде од прања танка по завршеном претакању вина није био карактеристичне светло крем боје (Sharma et al., 2006) већ значајно тамнији. Овакав изглед талога ксантана последица је присуства бојених материја, али и велике количине органских извора азота у подлози за биосинтезу (Ghashghaei et al., 2016) што и јесте специфично за отпадне воде које се генеришу у поменутој фази производног процеса (Bustamante et al., 2005). Како би се добио производ жеље-

них карактеристика потребно га је додатно пречистити. Будући да трошкови издвајања и пречишћавања ксантана из веома вискозне култивационе течности чине 50% укупних трошкова његове производње (Додић и Граховац, 2013), увођење додатних корака у циљу постизања одговарајућег степена пречишћености поскупело би целокупан производни процес. Највећа продукција ксантана остварена је на медијумима који су у својој основи садржали ефлуенте генерисане приликом прања танкова након бистрења шире таложењем (14,85 g/l) и ферментације (17,66 g/l). Имајући у виду да су управо ови медијуми по завршетку култивације били и највискознији (слика 5.4.) остварени резултати су у складу са очекивањима.

Ако се као показатељ успешности биосинтезе ксантана узме количина издвојеног биополимера по завршетку биопроцеса, отпадне воде које се генеришу током производње розе вина су боља сировинска база за припрему производног медијума него течни ефлуенти индустрије белог вина. То потврђују већи садржаји биосинтетисаног ксантана на свим испитиваним фракцијама отпадних вода из производње розе вина. Ипак, отпадни токови од прања танкова након бистрења шире таложењем и ферментације издвајају се као сировине са највећим потенцијалом примене у предложеном производном поступку. У поређењу са отпадном водом од прања танка након флотације, која се у претходним истраживањима показала као најпогоднија (табела 5.6.), на наведеним супстратима могуће је произвести за око 30%, односно 40% више ксантана, редоследом. Међутим, за најбољу процену успешности биосинтезе ксантана на одабраним ефлуентима индустрије розе вина потребно је добијене резултате упоредити са количином ксантана коју референтни производни сој продукује на стандардној полусинтетичкој подлози са глукозом. С обзиром да ова вредност износи 13,24 g/l (Вајић et al., 2015b) јасно је да су отпадни токови настали приликом прања танкова након бистрења шире и ферментације изузетно вредни супстрати јер су култивационе течности у чијој су основи садржале за око 10% и 25% више ксантана, редоследом. Битно је истаћи да је продуктивност одбраног производног соја у много већој мери изражена у овим медијумима него на агроиндустријским ефлуентима сличних карактеристика, попут некавалитетног сока од грожђа (Ghashghaei et al., 2016), екстракта датуле (Khosravi-Darani et al., 2011) и отпадних токова индустрије маслиновог уља (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996). Поред тога, отпадна вода од прања ферментационог танка већ на основу резултата лабораторијских истраживања представља одговарајућу замену за меласу која се од свих испитиваних алтернативних супстрата показала као најпогоднија за биосинтезу ксантана (Gilani et al., 2011b).

Остварене вредности конверзије шећера у ксантан налазиле су се у опсегу од 31,46% до 70,16% (табела 5.8) и међусобно су се статистички значајно разликовале ( $p < 0,001$ ). Како је почетни садржај редукујућих шећера у свим испитиваним медијумима био готово идентичан (слика 5.3) јасно је да је највећи степен конверзије супстрата у производ остварен за онај медијум у коме је количина биосинтетисаног ксантана била највећа. Култивација одабраног производног соја у лабораторијском биореактору на медијумима са отпадним водама од прања танкова након бистрења шире таложењем и ферментације резултирала је конверзијом извора угљеника у жељени биополимер од 58,57% и 70,16%, редоследом, што је у складу са вредностима које се остварују на индустријском нивоу (Palaniraj and Jayaraman, 2011).

Резултати дати у табели 5.8. показују да је највећа конверзија извора угљеника (77,78%) остварена на медијуму који је по завршетку култивације садржао највећу количину ксантана. Међутим између ове вредности, као и вредности истог параметра за медијум који је у својој основи садржао отпадну воду од прања танка након бистрења шире (75,94%) није утврђена статистички значајна разлика ( $p = 0,378$ ). С обзиром да је производни сој на овом медијуму продуковао мање ксантана јасно је да састав отпадног тока коришћеног за његову припрему није тако погодан за синтезу жељеног биополимера. У односу на наведене медијуме знатно мање извора угљеника конвертовано је у отпадним водама од прања муљаче (67,28%) и пресе (71,15%) које се међусобно

нису значајно разликовале у погледу вредности овог параметра ( $p=0,081$ ). Узимајући у обзир наведене податке, као и то да је садржај ксантана по завршетку биопроцеса у медијуму на бази ефлуента скупљеног током прања пресе био већи, утврђено је да се након муљања грожђа и у производњи розе вина генеришу ефлуенти веома погодни за умножавање биомасе и/или продукцију споредних метаболита. Најнижа, али не и занемарљива вредност вредност укупне конверзије шећера остварена је за отпадну воду од прања танка након претакања вина (61,23%).

На основу резултата приказаних у табели 5.8. може се уочити да се конверзија укупног азота налазила у опсегу од 46,19% до 69,43%, док је конверзија укупног фосфора била нешто већа, а кретала се од 79,82% до 90,18%. Применом статистичких теника потврђено је да су се испитивани медијуми међусобно значајно разликовали у погледу ових показатеља успешности биопроцеса ( $p<0,001$ ). Важно је напоменути да су наведене вредности и укупна конверзија шећера, приметно веће у односу на вредности истих параметара остварених приликом култивације одабраног производног соја на отпадним водама из производње белог вина (табела 5.6). Ако се узме у обзир да је у овом делу истраживања постигнута и боља продукција жељеног биополимера, јасно је да је биосинтеза ксантана на течним ефлуентима индустрије розе вина економски и еколошки прихватљивија.

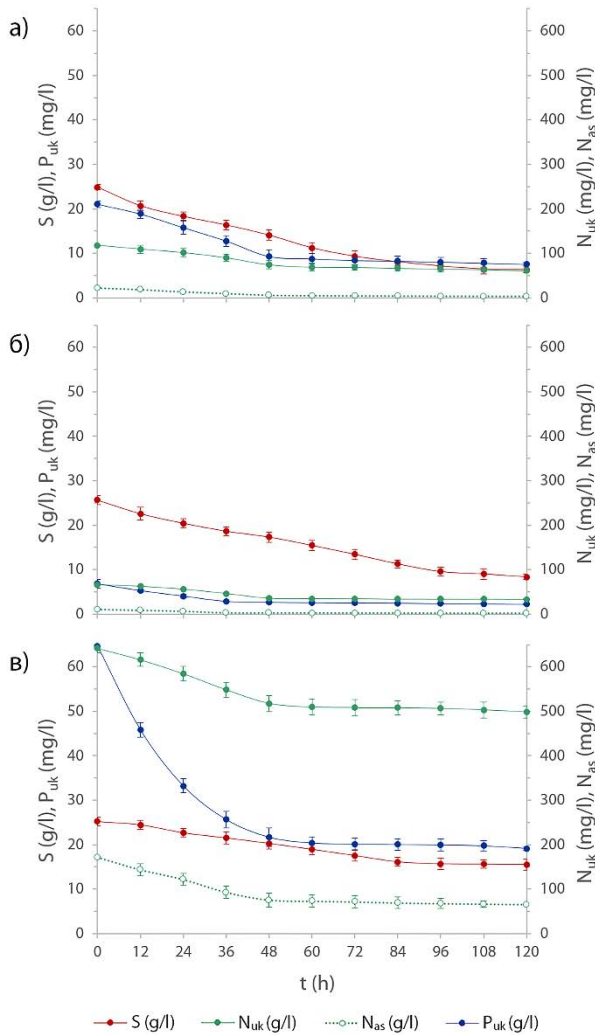
Могућност производње ксантана на свим испитиваним отпадним водама које се генеришу током производње розе вина експериментално је потврђена. Индикатори успешности биопроцеса указују да су се отпадни токови од прања танкова након бистрења шире таложеном и ферментације показали као најпогодније сировине за припрему медијума за биосинтезу ксантана. Међутим, без обзира на значајно мању продукцију жељеног биополимера, течни ефлуент који настаје приликом прања танка по завршеном бистрењу шире, посматрано са економског становишта биотехнолошке производње, има много већи потенцијал за примену у испитиваном производном поступку. Главни разлог за то је његова велика нутритивна вредност због које га није потребно додатно обогаћивати чистим хемикалијама. Стога је и сам начин припреме култивационог медијума релативно једноставан, а обухвата центрифугирање, разблаживање, додаток средства за пуферовање, корекцију вредности рН и стерилизацију.

### 5.3.1.3. Испитивање тока биосинтезе ксантана на отпадним водама из различитих фаза производње црвеног вина

На слици 5.5. (а-в) приказана је промена садржаја шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина генерисане током прања муљаче и танкова након ферментације и првог претакања вина, редоследом.

Резултати приказани на слици 5.5. и њихова статистичка обрада показују да се садржај шећера у свим испитиваним медијумима мењао веома различитом динамиком током читавог трајања биопроцеса. Иако се количина овог нутријента доступна производном соју на самом почетку култивације није статистички значајно разликовала међу медијумима ( $p=0,580$ ), уочена појава је последица различитог састава коришћених сировина (табела 5.4), односно неједнаких концентрација осталих нутријената одговорних за успешност овог биопроцеса. У медијуму чија је основа отпадна вода скупљена приликом прања танка након претакања вина (слика 5.5. в) током првих 12 h култивације садржај шећера се није значајно мењао ( $p=0,435$ ). Након овог периода значајна, али не и интензивна потрошња извора угљеника трајала је до 72 h ( $p<0,001$ ), а затим је готово стагнирала до краја биопроцеса ( $p=0,062$ ) када је поменути нутријент одређен у количини од 15,53 g/l. Смањење садржаја шећера у осталим медијумима било је интензивно од самог поче-





Слика 5.5. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина: а) муљање, б) ферментација и в) претакање

тка култивације. У медијуму на бази ефлуента генерисаног приликом прања танка по завршеној ферментацији (слика 5.5. б) наведена промена забележена је до 96 h ( $p < 0,001$ ) после чега више није била статистички значајна ( $p = 0,209$ ). Неискоришћена количина шећера у овом медијуму износила је 8,32 g/l. У медијуму који је у својој основи садржао отпадну воду од прања муљаче (слика 5.5. а) интензивно смањење количине анализираних нутријената примећено је до 84 h култивације ( $p < 0,001$ ). После наведеног периода па до краја извођења биопроцеса потрошња шећера скоро да није ни детектована ( $p = 0,069$ ), а његов садржај у култивационој течности износио је 6,29 g/l.

Поређењем количина шећера које заостају у култивационим течностима утврђено је да су се сви испитивани медијуми значајно разликовали у погледу овог параметра ( $p < 0,001$ ) што је директна последица евидентних разлика у метаболичкој активности одабраног производног соја. Поред тога, утврђено је да ни у медијумима на бази отпадних вода из производње црвеног вина након 96 h култивације не долази до значајне потрошње шећера, а сходно томе ни до биосинтезе ксантана, због чега се предлаже скраћење времена трајања биопроцеса за 24 h. Ово се не би негативно одразило на ефикасност биосинтезе, а довело би до смањења непродуктивног времена.

На основу резултата приказаних на слици 5.5. може се уочити да се количина азота коју су испитивани медијуми садржали на почетку биопроцеса значајно разликовала ( $p < 0,001$ ). Имајући у виду да су коришћене сировине веома различитог састава (табела 5.4) и да је приликом припреме медијума вршена корекција само садржаја шећера, добијени резултати су очекивани. Највише азота детектовано је у медијуму који је у својој основи садржао отпадну воду од прања танка након претакања вина (642,00 mg/l), значајно мања количина утврђена је у медијуму на бази отпадног тока од прања муљаче (117,77 mg/l), док је најмање азота садржао медијум чија је основа течни ефлуент генерисан приликом прања ферментационог танка (66,31 mg/l).

Статистичком анализом резултата приказаних на слици 5.5. утврђено је да се количина укупног азота присутна у свим испитиваним медијумима током култивације одабраног производног соја мењала веома различитом динамиком што указује на разлике у његовој метаболичкој активности. Како се у медијуму који је у својој основи садржао течни ефлуент скупљен приликом прања танка након претакања вина (слика 5.5. в) током првих 12 h култивације, поред садржаја шећера, није значајно мењао ни садржај укупног азота ( $p = 0,060$ ) може се претпоставити да се у овом периоду

одвијало прилагођавање производног микроорганизма на новонастале услове средине. Након тога уследила је његова интензивна метаболичка активност што се може закључити на основу значајне потрошње поменутог нутријента. Ова фаза трајала је до 48 h ( $p < 0,001$ ) после чега се садржај укупних азотних компоненти није значајно мењао до краја биопроцеса ( $p = 0,217$ ) када је износио 498,67 mg/l. Иако се у медијуму на бази отпадне воде од прања муљаче (слика 5.5. а) садржај шећера интензивно смањивао од почетка биопроцеса, у првих 12 h култивације одабраног производног соја није уочена значајна потрошња укупног азота ( $p = 0,174$ ). Интензивно смањење количине азотних једињења забележено је након наведеног периода а трајало је до 48 h култивације ( $p < 0,001$ ) после чега је било готово безначајно до 120 h ( $p = 0,061$ ). По завршетку биопроцеса добијена култивациона течност садржала је 61,41 mg/l неискоришћеног азота. У медијуму чија је основа отпадни ток настао прањем ферментационог танка (слика 5.5. б) концентрација свих азотних компоненти се значајно смањивала од почетка култивације до 48 h ( $p < 0,001$ ), након чега се није приметно мењала до краја биопроцеса ( $p = 0,184$ ). Резидуални садржај укупног азота у наведеном медијуму износио је 33,37 mg/l. Статистичком анализом је доказано да се количина азота која заостаје у култивационим течностима по завршетку биосинтезе ксантана значајно разликује између свих испитиваних медијума ( $p < 0,001$ ) што је утврђено и анализом узорака на почетку биопроцеса.

С обзиром да и отпадне воде које се генеришу током различитих фаза производње црвеног вина карактерише много већа количина укупног азота од асимилабилног (табела 5.4) јасно је зашто је овај однос примећен и у медијумима припремљеним на бази ових сировина. Тако, највећа количина асимилабилног азота одређена је у медијуму који је у својој основи садржао отпадну воду од прања танка након претакања вина (171,86 mg/l), значајно мањи садржај ових компоненти утврђен је у медијуму на бази ефлуента генерисаног током прања муљаче (22,47 mg/l), док је медијум са отпадним током од прања ферментационог танка садржао најмање асимилабилног азота (10,70 mg/l). Статистичком обрадом наведених вредности доказано је да се садржај лако усвојивих азотних компоненти значајно разликовао између свих испитиваних култивационих медијума ( $p < 0,001$ ).

Применом статистичких тестова за анализу експерименталних резултата датих на слици 5.5. доказана је значајно различита динамика промене садржаја укупног и асимилабилног азота током извођења биосинтезе у примењеним условима. На првом месту, уочена је интензивна потрошња аминок и амонијачног азота у свим испитиваним медијумима од самог почетка култивације. Као и код биосинтезе ксантана на отпадним водама из производње белог вина, ово може бити последица мањег садржаја наведених азотних компоненти у односу на количину укупног азота због чега значајна потрошња лако усвојивих азотних једињења не мора у приметној мери утицати на промену садржаја свих присутних азотних компоненти. Поред тога, моменат престанка потрошње асимилабилног азота, поклапа се са временом после којег не долази до значајне промене садржаја укупног азота. Ово је уочено код свих медијума осим оног чија је основа отпадна вода скупљена приликом прања ферментационог танка (слика 5.5. б). Код овог медијума значајна потрошња укупног азота детектована је до 48 h култивације, док се аминок и амонијачни азот интензивно трошио само до 36 h ( $p < 0,001$ ). Од 36 h до 120 h промена садржаја асимилабилног азота у наведеном медијуму није била статистички значајна ( $p = 0,285$ ), а по завршетку биопроцеса детектована количина ових азотних једињења износила је 1,83 mg/l. У медијумима на бази отпадних вода од прања муљаче (слика 5.5. а) и танка након претакања вина (слика 5.5. в) значајна потрошња асимилабилних азотних једињења трајала је до 48 h ( $p < 0,001$ ). Од овог момента па до краја биопроцеса количина аминок и амонијачних компоненти у наведеним медијумима није се значајно мењала што потврђују  $p$ -вредности од 0,055 и 0,383, редоследом. На крају култивације анализирани култивациони медијуми садржали су 3,25 mg/l и 65,80 mg/l асимилабилног азота, редоследом.

Статистичком обрадом података који се односе на резидуалне садржаје асимилабилног азота утврђено је да се вредност овог параметра значајно разликује између свих анализираних узорак култивационих течности ( $p < 0,001$ ) што је утврђено и на почетку биопроцеса. Битно је истаћи да се количина утрошених аминокиселина и амонијачних једињења за све испитиване медијуме кретала у опсегу од 8,87 mg/l до 106,06 mg/l док је потрошња укупног азота била приметно већа и налазила се у интервалу од 32,93 mg/l до 143,33 mg/l. Ово је потврда да се и у отпадним водама из производње црвеног вина, али и у течним ефлуентима винарија уопште, налазе и друге азотне компоненте које одабрани производни сој у примењеним условима може да усваја и метаболише.

Резултати приказани на слици 5.5. указују да се почетни садржај укупног фосфора значајно разликовао међу медијумима ( $p < 0,001$ ) што је, као и код азота, последица различитог састава сировина (табела 5.4), а пре свега примењеног начина припреме култивационих медијума. Највише фосфора садржао је медијум чија је основа отпадна вода генерисана приликом прања танка након претакања вина (64,67 mg/l), значајно мање количине детектоване су у медијуму на бази отпадног тока са муљаче (21,06 mg/l), док је најмањи садржај овог нутријента одређен у медијуму који је у својој основи садржао течни ефлуент скупљен током прања ферментационог танка (6,81 mg/l).

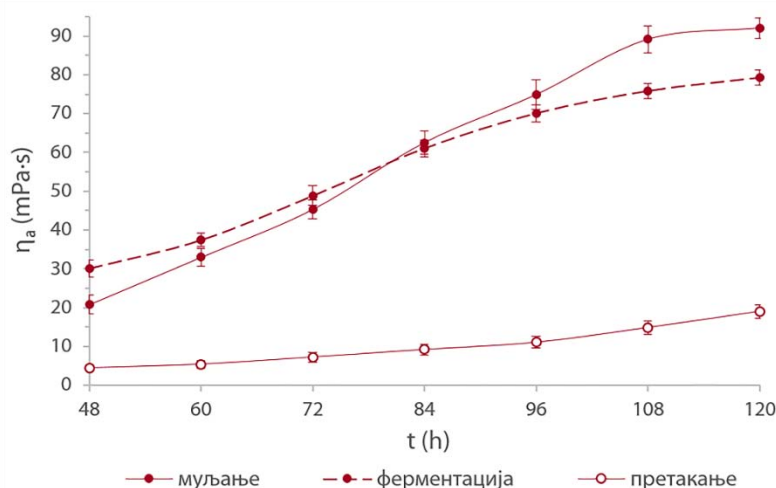
Статистичким техникама доказано је да се садржај укупног фосфора у свим испитиваним култивационим медијумима значајно смањивао од почетка биопроцеса, а период интензивне потрошње овог лимитирајућег нутријента у потпуности се поклопио са временом у коме је и смањење количине асимилабилног азота било најзначајније. Тако је у медијуму чија је основа отпадна вода генерисана приликом прања ферментационог танка (слика 5.5. б) значајно смањење садржаја укупног фосфора забележено до 36 h култивације ( $p < 0,001$ ) после чега је било готово неприметно до краја биопроцеса ( $p = 0,070$ ). Важно је напоменути да је у овом огледу потрошња укупног азота трајала 12 h дуже. Међутим, како је наведени медијум садржао изузетно мале количине укупног, а самим тим и лако усвојивог фосфора, није необично што је одабрани производни сој у краћем временском периоду утрошио све доступне фосфорне компоненте. Количина фосфора која је заостала у овом медијуму по завршетку култивације износила је 2,20 mg/l. У медијумима на бази отпадних токова скупљених током прања муљаче (слика 5.5. а) и танка по завршеном претакању вина (слика 5.5. в) потрошња фосфорних једињења била је интензивна до 48 h ( $p < 0,001$ ), а након овог периода до краја култивације готово да није ни примећена ( $p = 0,106$  и  $p = 0,067$ , редоследом). Резидуални садржаји укупног фосфора у наведеним медијумима износили су 7,57 mg/l и 19,15 mg/l, редоследом. Статистичким поређењем утврђено је да се вредности количине фосфора детектоване по завршетку биопроцеса међусобно значајно разликују ( $p < 0,001$ ). Испитивањем узорак култивационих течности непосредно по инокулацији добијени су исти резултати.

Промена садржаја најважнијих нутријената у култивационим медијумима чија су основа отпадне воде из различитих фаза производње црвеног вина (слика 5.5.) директан је показатељ да се метаболичка активност одабраног производног соја у примењеним условима несметано одвијала. Ипак, како би се утврдило да је у испитиваним супстратима осим умножавања биомасе дошло и до синтезе жељеног биополимера, од момента промене услова култивације вршена су и реолошка мерења. Добијени резултати фитовани су степеним законом да би се одредили индекс тока и фактор конзистенције. Високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,990$ ) указују на веома добро поклапање мерених вредности са наведеном функционалном зависношћу. Дефинисане вредности реолошких параметара приказане су у табели 5.9.

Табела 5.9. Реолошке карактеристике медијума чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина током биосинтезе ксантана

t (h)	муљање		ферментација		претакање	
	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )
48	0,4457	0,3289	0,4583	0,4468	0,6599	0,0242
60	0,4350	0,5503	0,4059	0,7218	0,5386	0,0538
72	0,3711	1,0396	0,3906	1,0164	0,5162	0,0804
84	0,3200	1,8513	0,3348	1,6783	0,5089	0,1059
96	0,3124	2,3030	0,3313	1,9605	0,4888	0,1407
108	0,3080	2,8011	0,3229	2,2117	0,4605	0,2180
120	0,3046	2,9433	0,3220	2,3224	0,4437	0,3039

Параметри приказани у табели 5.9. показују да је култивација одабраног производног соја довела до промене реолошког понашања свих испитиваних медијума. Повећање вредности фактора конзистенције указује на пораст вискозитета медијума током извођења биопроцеса, док вредности индекса тока мање од један доказују псеудопластичан тип протицања који је са временом трајања култивације постајао израженији што потврђује смањење вредности овог реолошког параметра. Све уочене промене несумњиво потврђују да је у примењеним условима дошло до продукције ксантана на испитиваним отпадним водама из производње црвеног вина. На основу дефинисаних вредности реолошких параметара израчунати су привидни вискозитети медијума на бази ових ефлуената (део 4.6.2), а њихова промена током трајања биопроцеса приказана је на слици 5.6.



Слика 5.6. Промена вискозитета медијума чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина током биосинтезе ксантана

Статистичком анализом добијених резултата утврђено је да се привидни вискозитет испитиваних медијума значајно мењао током трајања култивације ( $p < 0,001$ ) што је јасан показатељ продукције ксантана. На основу динамике и интензитета промене овог параметра могуће је проценити

разлике у количини и квалитету синтетисаног биополимера. Већ од почетка мерења примећене су значајне разлике у погледу привидног вискозитета култивационих медијума ( $p < 0,001$ ). У 48 h највискознија је била култивациона течност која је у својој основи садржала ефлуент генерисан током прања ферментационог танка (30,06 mPa·s), значајно мањи привидни вискозитет одређен је за медијум са отпадном водом од прања муљаче (20,78 mPa·s), док је најмање вискозан био медијум чија је основа отпадни ток скупљен приликом прања танка по завршеном претакању вина (4,45 mPa·s).

Интензивно повећање привидног вискозитета од почетка мерења уочено је код медијума за чију су припрему коришћени ефлуенти настали током прања муљаче и ферментационог танка. Значајан пораст вредности анализираних параметра за наведене медијуме забележен је до 108 h ( $p < 0,001$ ), док са даљим извођењем биопроцеса готово да није ни детектован ( $p = 0,240$  и  $p = 0,067$ , редоследом). По завршетку култивације вредности привидног вискозитета испитиваних медијума износили су 92,08 mPa·s и 79,23 mPa·s, редоследом. С обзиром да у последњих 12 h култивације потрошња шећерних компоненти, а самим тим ни продукција ксантана нису били значајни код оба наведена медијума, повећање привидног вискозитета у овом периоду може бити последица умрежавања биосинтетисаних макромолекула и формирања сложенијих структурних облика (García-Ochoa et al., 2000). Са друге стране, код медијума чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина у периоду од 48 h до 60 h култивације нису уочене значајне промене привидног вискозитета ( $p = 0,406$ ). Након наведеног периода забележено је значајно ( $p < 0,001$ ), али много мање интензивно повећање привидног вискозитета које је трајало до краја извођења биопроцеса када је измерена вредност овог параметра износила 19,01 mPa·s. Статистичком обрадом резултата утврђено је да су се све култивационе течности значајно разликовале у погледу привидног вискозитета ( $p < 0,001$ ), а узимајући у обзир да се биосинтеза ксантана на свим медијумима одвијала при идентичним условима применом истог производног соја уочене разлике вероватно су последица различитог састава коришћених сировина.

С обзиром да се на основу вредности привидног вискозитета медијума не може тачно проценити успешност производње ксантана на течним ефлуентима индустрије црвеног вина, култивационе течности по завршетку биопроцеса анализирани су у погледу количине синтетисаног биополимера, а израчунати су и степен конверзије супстрата у жељени производ, као и укупне конверзије свих значајних нутријената. Добијени резултати обрађени су статистичким (део 4.7) и као такви приказани су у табели 5.10.

Табела 5.10. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина

Отпадна вода	P (g/l)*	K <sub>P/S</sub> (%)*	K <sub>S</sub> (%)*	K <sub>N</sub> (%)*	K <sub>P</sub> (%)*
муљање	11,97±0,32 <sup>b</sup>	48,06±0,40 <sup>b</sup>	74,69±3,07 <sup>c</sup>	47,86±1,53 <sup>b</sup>	64,08±0,74 <sup>a</sup>
ферментација	16,46±0,67 <sup>c</sup>	64,25±3,55 <sup>c</sup>	67,57±1,02 <sup>b</sup>	49,68±1,08 <sup>b</sup>	67,37±3,29 <sup>ab</sup>
претакање	9,24±0,53 <sup>a</sup>	36,65±1,28 <sup>a</sup>	38,41±2,53 <sup>a</sup>	22,34±0,83 <sup>a</sup>	70,39±0,39 <sup>b</sup>

\* Вредности у једној колони обележене истим словима налазе се на истом нивоу значајности у интервалу поверења од 95% (Данканов тест вишеструких поређења).

У оквиру ове фазе истраживања такође је потврђено да успешност биотехнолошке производње ксантана на природним медијумима чија су основа ефлуенти различитих грана прехранбене индустрије веома зависи од порекла основне сировине, односно од фазе производног процеса у

којој се генерише (López et al., 2001). Резултати приказани у табели 5.10. указују да су сви испитивани медијуми по завршетку биопроцеса садржали значајно различите количине ксантана ( $p < 0,001$ ). Најмања продукција ксантана остварена је на медијуму чија је основа отпадна вода од прања танка након претакања вина (9,24 g/l). Ако се узме у обзир да је поменути медијум по завршетку биопроцеса био и најмање вискозан (слика 5.6) може се рећи да су добијени резултати делимично очекивани. Наиме, због изразито малог привидног вискозитета претпостављено је да ће се из добијене култивационе течности издвојити многа мања количина ксантана. Међутим, како то није био случај, јасно је да је ксантан продукован на овом медијуму веома лошег квалитета. Томе доприноси и његова изузетно тамна боја која је карактеристична за биополимере произведене на култивационим медијумима са значајном количином органских извора азота (Ghashghaei et al., 2016), а који су у количинама које нису занемарљиве присутни у отпадним токовима који се генеришу након претакања вина (Bustamante et al., 2005). Поред тога, много тамнија боја ксантана биосинтетисаног на наведеном медијуму у односу на биополимер издвојен из медијума са отпадном водом која настаје у истој фази производње розе вина може бити и последица присуства значајних количина антоцијана, једињења одговорних за црвену боју вина (He et al., 2012). Медијум на бази отпадног тока скупљеног приликом прања муљаче по завршетку биопроцеса садржао је значајно већу количину ксантана (11,97 g/l). Иако се на основу вредности привидног вискозитета очекивала највећа продукција жељеног производа управо на овом медијуму (слика 5.6.), након издвајања биополимера у количини мањој него што је очекивано јасно је да је велики привидни вискозитет култивационе течности последица продукције ксантана изузетно вредних реолошких карактеристика. Примењени производни сој је на отпадној води која се генерише током прања ферментационог танка биосинтетисао највише ксантана (16,46 g/l) који је према резултатима реолошких мерења нешто лошијег квалитета (слика 5.6).

Литературни наводи указују да отпадне воде које се генеришу током производње црвених вина нису погодна средина за раст и умножавање микроорганизама због чега је биолошка разградња загађујућих материја присутних у овим отпадним токовима веома отежана (Vlyssides et al., 2005). Међутим, резултати претходно изведених огледа нису у складу са наведеним подацима већ доказују да су поменути ефлуенти одлични супстрати за биотехнолошку производњу ксантана. Тако, ако је индикатор успешности биопроцеса количина издвојеног биополимера, отпадна вода од прања ферментационог танка најпогоднија је сировина. На наведеном супстрату могуће је произвести 35%, односно 10% више ксантана него на отпадним токовима који настају приликом прања танкова након бистрења шире у производњи белог (табела 5.6) и розе вина (табела 5.8), редоследом, а који су у ранијим фазама истраживања селектовани као сировине са највећим потенцијалом примене у испитиваном биопроцесу. Поређењем добијених резултата са количином ксантана коју референтни производни сој продукује на традиционално примењиваној подлози са глукозом (Вајић et al., 2015b) најбоље се може проценити успешност биосинтезе ксантана на одабраном ефлуенту индустрије црвеног вина. Како је по завршетку биопроцеса медијум на бази отпадне воде од прања ферментационог танка садржао око 20% више ксантана неоспорно је да је испитивани ефлуент веома добра замена за стандардну полусинтетичку подлогу. Поред тога, продуктивност одабраног производног соја је значајно израженија на овом него на медијумима чија су основа слични агроиндустријски отпадни токови, односно сок од грожђа лошег квалитета (Ghashghaei et al., 2016), екстракт датуле (Khosravi-Darani et al., 2011) и ефлуенти индустрије маслиновог уља (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996), док је у поређењу са меласом нижа за мање од 5% (Gilani et al., 2011b) што додатно потврђује квалитет отпадне воде која се генерише прањем танка по завршеној ферментацији кљука као сировине за биосинтезу ксантана.

У медијумима који су у својој основи садржали отпадне токове из производње црвеног вина током култивације одабраног производног соја конвертовано је од 36,65% до 64,25% извора угљеника у ксантан (табела 5.10) при чему су се ове вредности статистички значајно разликовале ( $p < 0,001$ ).

Као и у претходно изведеним огледима највећи степен конверзије супстрата у производ остварен је за медијум у коме је количина синтетисаног биополимера била највећа. Успешно изведена производња ксантана у индустријским размерама подразумева да се минимално 50% шећера из подлоге конвертује у ксантан (Palaniraj and Jayaraman, 2011) што је у примењеним условима остварено у медијуму са отпадном водом од прања ферментационог танка.

Резултати дати у табели 5.10. показују да се укупна конверзија шећера значајно разликовала међу медијумима ( $p < 0,001$ ), а налазила у интервалу од 38,41% до 74,69%. Највећа вредност овог параметра остварена је за медијум чија је основа ефлуент од прања муљаче. Како овај медијум по завршетку биопроцеса није садржао највећу количину ксантана још једном је потврђено да се након муљања грозђа у производњи црвеног вина генеришу ефлуенти који су у примењеним експерименталним условима погоднији за умножавање биомасе и/или синтезу других метаболита. С обзиром да је укупна конверзија шећера остварена за отпадну воду од прања танка након претакања вина веома ниска, може се претпоставити да је количина биосинтетисаног ксантана на овом медијуму привидно велика. Томе иду у прилог веома мали вискозитет култивационе течности одређен по завршетку биопроцеса (слика 5.6), као и тамна боја талоба која указује да су поред жељеног биополимера исталожени и неки пигменти, као и бројне друге нечистоће.

Према резултатима приказаним у табели 5.10. вредности конверзија других важних нутријената, односно азота и фосфора, статистички значајно су се разликовале међу испитиваним медијумима ( $p < 0,001$  и  $p = 0,022$ , редоследом). Конверзија укупног азота кретала се од 22,34% до 49,68%, док се конверзија укупног фосфора налазила у опсегу од 64,08% до 70,39%. Ако се вредности показатеља успешности биосинтезе ксантана добијене у овим огледима упореде са резултатима претходних испитивања (табела 5.6) може се приметити да се на отпадним водама које се генеришу током производње белог и црвеног вина конвертују подједнаке количине свих значајних нутријената, али које резултирају значајно различитом продукцијом жељеног биополимера.

Током ове фазе истраживања експериментално је потврђена могућност производње ксантана на свим испитиваним отпадним токовима који се генеришу приликом производње црвеног вина. Добијени резултати јасно упућују да је највећа успешност биопроцеса остварена на медијуму са отпадном водом од прања ферментационог танка. Оно што би се могло сматрати основним недостатком овог супстрата јесте изузетно мали садржај шећера због чега је приликом припреме медијума за биосинтезу ксантана неопходно додати готово сву потребну количину извора угљеника. Међутим, и поред тога, припрема култивационог медијума на бази поменутог ефлуента је прилично једноставна, а обихвата центрифугирање, обогаћивање, додатак средства за пуферовање, корекцију вредности рН и стерилизацију.

### **5.3.2. Испитивање тока биосинтезе ксантана на намешаним отпадним водама винарија**

Анализом резултата испитивања тока биосинтезе ксантана на појединачним фракцијама отпадних вода из различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина утврђено је да је примењени производни сој на појединим ефлуентима продуковао ксантан у подједнаким или већим количинама него на традиционално примењиваној полусинтетичкој подлози са глукозом. Велики потенцијал примене ових отпадних токова у предложеном биотехнолошком поступку потврђују и високе вредности конверзија најзначајнијих нутријената. Ипак, јасно је да се највећа ефикасност биопроцеса може постићи употребом отпадних вода које садрже све нутријенте у довољним количинама за успешно одвијање биосинтезе ксантана. Чак и ако је њихова концеп-

нтрација већа од оптималне, одговарајући састав подлоге остварује се разблаживањем конкретног ефлуента. У те сврхе се, поред водоводске или бунарске воде квалитета воде за пиће, потенцијално могу користити и отпадни токови генерисани у истом производном процесу, али у фазама производње у којима испуштене ефлуенте карактерише смањен садржај нутријената, а пре свега ометајућих фактора.

Приликом припреме шире за производњу белог или розе вина у истом дану настају отпадне воде екстремно различитог састава. Како је у претходним истраживањима доказано да су ови отпадни токови изузетно погодне сировине за припрему медијума за биосинтезу ксантана, њиховим намешавањем такође би се могли добити адекватни медијуми. Намешавање отпадних вода од прања муљаче, пресе и танка након бистрења шире је могуће јер се генеришу у кратком временском периоду, а осим санитарних и евентуално атмосферских отпадних вода, у наредних недеља дана, па чак и дуже, у винаријама нема других значајних ефлуената (Galitsky et al., 2005). Стога би сакупљање отпадних токова из каснијих фаза производње вина са циљем примене као компоненте медијума за биосинтезу ксантана, који се добија намешавањем течних ефлуената винарије, било веома тешко првенствено у погледу обезбеђивања услова складиштења у којима не би дошло до промене њиховог састава.

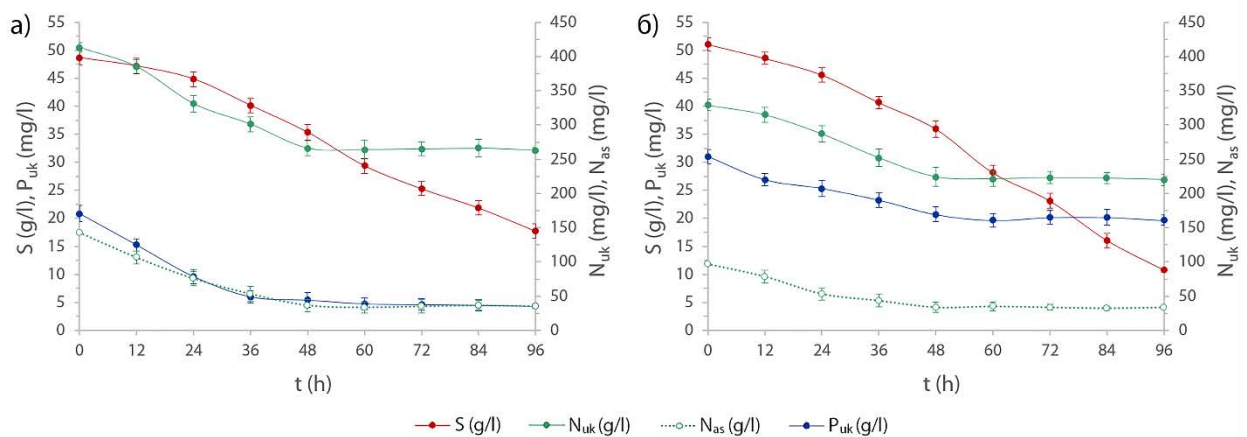
Узимајући у обзир све наведено, истраживања из оквира ове докторске дисертације обухватала су и испитивање успешности биосинтезе ксантана на намешаним отпадним водама винарија (Rončević et al., 2016) за шта су коришћене отпадне воде из производње белог и розе вина скупљене током прања муљаче и пресе, као и танкова након бистрења шире флотацијом и таложењем уз додатак пектолитичких ензима, редоследом. Припрема медијума обухватала је намешавање наведених отпадних токова тако да почетни садржај шећера буде 50 g/l, који је према литературним подацима препоручена концентрација извора угљеника за постизање максималне продукције ксантана (Lo et al., 1997).

Резултати претходно изведених огледа указују да је време трајања култивације критични параметар биосинтезе ксантана у примењеним условима. Смањење непроизводног времена је један од главних захтева биотехнолошке производње и изузетно је важно ако се посматра са економског становишта. Иако се биосинтеза ксантана у одређеној мери одвија у свим фазама раста производног соја, до максималне продукције долази тек након фазе интензивног раста и размножавања ћелија (Becker et al., 1998). Међутим, не може се јасно дефинисати граница престанка умножавања биомасе и почетка значајније синтезе жељеног биополимера, док укупно време трајања биопроцеса зависи од више фактора, међу којима су посебно значајни састав медијума и процесни услови (García-Ochoa et al., 2000). Током претходних истраживања утврђено је да у последњих 24 h култивације одабране производне културе на свим испитиваним отпадним водама винарија у примењеним условима не долази до значајне потрошње шећера, а самим тим ни до продукције ксантана. Ово је јасан показатељ да се време извођења биопроцеса може скратити на 96 h без негативних последица по његову ефикасност. До истих резултата дошли су и други аутори испитивањем тока култивације референтног производног соја на медијумима са глукозом (Funahashi et al., 1987), меласом шећерне репе (Moosavi-Nasab et al., 2010) и сурутком (Savvides et al., 2012). С обзиром да је време трајања биосинтезе дефинисано на 96 h одговарајућа корекција вредности процесних параметара у наставку истраживања вршена је након 36 h. За разлику од првобитно изведених огледа, током производње ксантана на намешаним отпадним водама винарија у каснијим фазама култивације вршена је корекција вредности рН како би се овај параметар одржао у оптималним границама (6,0-8,0) за постизање максималне продукције биополимера (Mirik et al., 2011). Опадање вредности рН током извођења овог биотехнолошког процеса последица је продукције различитих метаболита, а пре свега ксантана који садржи киселе функционалне групе (Anbuselvi et al., 2012).



Одмах након промене услова уочено је формирање постојане пене на површини култивационе течности која је у својој основи садржала отпадне токове из производње белог вина. Узимајући у обзир запажања из претходних истраживања, као и чињеницу да је доминантна компонента овог медијума отпадна вода генерисана приликом прања танка након бистрења шире флотацијом, уочена појава је очекивана, а последица је високог садржаја протеина који се у винарству користе као средства за бистрење (Bustamante et al., 2005).

На слици 5.7. (а-б) приказана је промена садржаја шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из различитих фаза производње белог и розе вина, редоследом.



Слика 5.7. Промена садржаја нутријената током биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из производње белог (а) и розе (б) вина

Графички приказани резултати (слика 5.7) и њихова статистичка обрада показују да се садржај редукујућих шећера у оба медијума значајно мењао током трајања биопроцеса ( $p < 0,001$ ). У медијуму чија су основа отпадне воде из производње розе вина (слика 5.7. б) забележена је интензивна потрошња шећерних компоненти током свих 96 h култивације ( $p < 0,001$ ). По завршетку биопроцеса добијена је култивациона течност која је садржала 10,77 g/l неискоришћених шећера. Са друге стране, у медијуму на бази течних ефлуената индустрије белог вина (слика 5.7. а) промена концентрације извора угљеника није била значајна у првих 12 h култивације ( $p = 0,188$ ). Након овог периода уочено је интензивно смањење садржаја шећера до краја биосинтезе ( $p < 0,001$ ) када је поменути нутријент детектован у количини од 17,74 g/l. Интересантно је напоменути да се количине шећерних компоненти коју су обе подлоге садржале до 72 h култивације нису међусобно значајно разликовале ( $p = 0,104$ ). Међутим, статистички значајно различити резидуални садржаји редукујућих шећера у култивационим течностима ( $p = 0,001$ ) вероватно су последица интензивније метаболичке активности одабраног производног соја на медијуму са намешаним отпадним токовима индустрије розе вина.

На основу резултата приказаних на слици 5.7. може се приметити да се количина укупног азота коју су испитивани медијуми садржали на почетку биопроцеса значајно разликовала ( $p < 0,001$ ) при чему је већа количина азотних компоненти детектована у медијуму са отпадним водама из производње белог вина (413,00 mg/l), него на намешаним ефлуентима индустрије розе вина (329,00 mg/l) што је последица различитог састава коришћених сировина (табеле 5.2. и 5.3). Без обзира на значајно другачији садржај овог важног лимитирајућег нутријента, статистичком ана-

лизом је утврђено да се метаболичка активност одабраног производног соја на наведеним медијумима мењала готово идентичном динамиком током читавог трајања биосинтезе. Доказано је да се концентрација азотних једињења интензивно смањивала до 48 h ( $p < 0,001$ ), након чега се није значајно мењала до краја култивације што потврђују  $p$ -вредности од 0,761 и 0,688 за отпадне воде генерисане током производње белог и розе вина, редоследом. Неискоришћена количина укупног азота која је одређена у наведеним медијумима по завршетку биопроцеса међусобно се статистички значајно разликовала ( $p = 0,001$ ), а износила је 263,00 mg/l и 220,00 mg/l, редоследом.

С обзиром да све отпадне воде из производње белог и розе вина употребљене током ове фазе истраживања карактерише много већи садржај укупног азота од асимилабилног (табеле 5.2. и 5.3) јасно је зашто је ово забележено и у медијумима који су припремљени намешавањем наведених сировина (слика 5.7). Већа количина аминок и амонијачног азота одређена је у медијуму на бази отпадних токова из производње белог вина (142,80 mg/l), а статистички значајно се разликовала ( $p < 0,001$ ) од садржаја ових компоненти у медијуму чија су основа ефлуенти генерисани током производње розе вина (96,60 mg/l). Применом статистичких техника доказана је слична динамика промене садржаја укупног и асимилабилног азота током извођења биосинтезе ксантана у примењеним условима на оба испитивана медијума. Дакле, уочена је интензивна потрошња аминок и амонијачног азота до 48 h култивације ( $p < 0,001$ ), док у наставку биопроцеса промена садржаја ових азотних једињења није била статистички значајна о чему сведоче  $p$ -вредности од 0,853 и 0,104 за отпадне токове индустрије белог и розе вина, редоследом. По завршетку култивације поменути медијуми садржали су 35,00 mg/l и 33,60 mg/l асимилабилног азота, редоследом. Значајно је приметити да се промена процесних услова у 36 h биопроцеса није одразила на промену динамике усвајања како укупног, тако и асимилабилног азота јер се уочени тренд смањења садржаја овог нутријента наставља до 48 h код оба испитивана медијума.

Статистичким поређењем резидуалних садржаја аминок и амонијачног азота у култивационим течностима утврђено је да се добијене вредности нису значајно разликовале ( $p = 0,063$ ). Како ово није утврђено на почетку биопроцеса јасно је да је одабрани производни сој на отпадним токовима из производње белог вина метаболисао много већу количину поменутих азотних једињења. Поред тога, важно је напоменути да је количина утрошених аминок и амонијачних компоненти за медијуме на бази отпадних вода индустрије белог и розе вина износила 107,80 mg/l и 63,00 mg/l, редоследом, док је потрошња укупног азота у анализираним медијумима је била приметно већа (150,00 mg/l и 109,00 mg/l, редоследом). Ово је очекивано на основу претходно изведених експеримената.

Анализа резултата приказаних на слици 5.7. указује да су се испитивани медијуми значајно разликовали у погледу почетног садржаја укупног фосфора ( $p = 0,001$ ) што је резултат употребе сировина веома различитог састава (табеле 5.2. и 5.3.). Помоћу статистичких тестова утврђено је да се концентрација поменутог нутријента у оба медијума значајно смањивала од почетка биопроцеса. Међутим, у медијуму са отпадним водама из производње белог вина (слика 5.7. а) период интензивне потрошње овог лимитирајућег нутријента делимично се поклапа са временом у коме је и смањење количине азота било најзначајније. У овом медијуму значајно смањење садржаја укупног фосфора забележено до 36 h култивације ( $p < 0,001$ ), што се поклапа са временом у коме су промењени производни услови, док је потрошња азотних једињења трајала 12 h дуже. С обзиром да је наведена подлога садржала изузетно мале количине укупног, а стога и лако усвојивог фосфора, јасно је да је производном соју потребно краће време да утроши све доступне фосфорне компоненте. Од 36 h до 96 h култивације потрошња фосфорних једињења готово да није ни детектована ( $p = 0,124$ ), а од почетних 20,84 mg/l у култивационој течности је заостало 4,36 mg/l фосфора. Имајући у виду да је период потрошње азотних компоненти био дужи може се претпоставити да заостали фосфор вероватно није у облику који је усвојив од стране

одабраног производног соја. У медијуму на бази отпадних токова скупљених током производње розе вина (слика 5.7. б) смањење количине фосфора било је интензивно до 48 h ( $p < 0,001$ ), а затим потпуно безначајно до краја биопроцеса ( $p = 0,382$ ) што указује да ако је у медијуму доступно довољно усвојивог фосфора промена услова производње нема утицај на његову потрошњу. Почетни и резидуални садржаји укупног фосфора у поменутом медијуму износили су 31,02 mg/l и 19,65 mg/l, редоследом. Статистичком анализом је доказано да су се култивационе течности добијене по завршетку биопроцеса међусобно значајно разликовале и у погледу количине неискоришћених фосфорних компоненти ( $p < 0,001$ ).

Потрошња најзначајнијих нутријената у медијумима чија су основа намешане отпадне воде из различитих фаза производње белог и розе вина (слика 5.7.) доказује да у примењеним условима није дошло до инхибиције метаболичке активности одабраног производног соја. Да би се потврдило да је на испитиваним медијумима остварена и биосинтеза ксантана, од момента промене услова вршена су реолошка мерења, а добијени резултати фитовани су степеним законом како би се дефинисали реолошки параметри. Релативно високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,978$ ) указују на веома добро поклапање мерених вредности са наведеном функционалном зависношћу. Одређене вредности индекса тока и фактора конзистенције приказане су у табели 5.11.

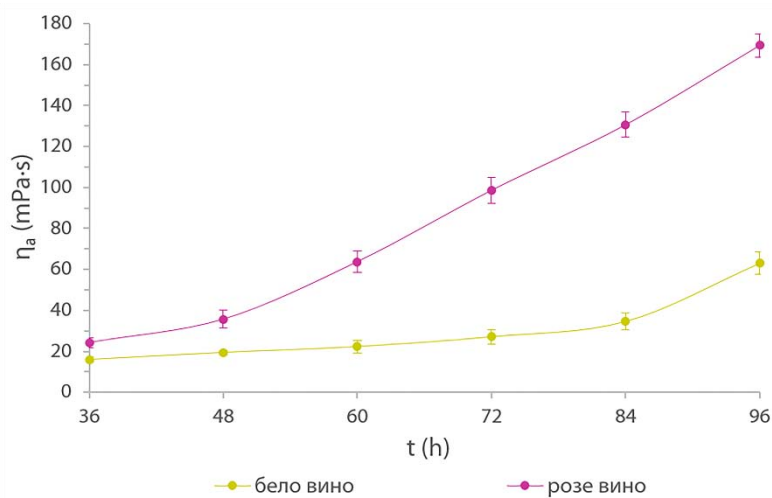
Табела 5.11. Реолошке карактеристике медијума чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина током биосинтезе ксантана

t (h)	бело вино		розе вино	
	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )
36	0,5955	0,1197	0,5829	0,1942
48	0,5440	0,1887	0,4883	0,4569
60	0,5175	0,2471	0,4143	1,1803
72	0,4965	0,3330	0,3347	2,7132
84	0,4572	0,5166	0,2975	4,3264
96	0,4480	0,9876	0,2794	6,1391

Резултати приказани у табели 5.11. показују да су се вредности фактора конзистенције за оба медијума повећавале са временом трајања култивације што је јасан показатељ да долази до промене реологије система. Поред тога, вредности индекса тока од почетка реолошких одређивања биле су мање од један чиме је утврђен псеудопластичан тип протикања. Псеудопластичан карактер култивационих течности постајао је израженији током извођења биопроцеса пошто су вредности овог параметра наставиле да се смањују. Наведене промене поуздано доказују да је одабрани производни сој у примењеним условима на намешаним отпадним водама винарија продуковао ксантан. Стога су помоћу вредности реолошких параметара изачунати привидни вискозитети ових медијума, а њихова промена током трајања биосинтезе графички је приказана на слици 5.8.

На основу резултата представљених на поменутој слици може се приметити да се привидни вискозитет испитиваних медијума мењао драстично различитим интензитетима током читавог трајања биопроцеса. Ово је потврђено и статистичком обрадом експерименталних података према којој се значајна разлика у привидним вискозитетима медијума јавља од самог почетка

реолошких мерења ( $p=0,007$ ). Медијум са отпадним токовима из производње белог вина у 36 h култивације био је мање вискозан, а до 60 h вредност овог параметра није се значајно променила у односу на почетних 15,95 mPa·s ( $p=0,055$ ). Након наведеног периода па до краја биосинтезе забележено је значајније повећање привидног вискозитета медијума ( $p<0,001$ ) при чему је ова промена била најинтензивнија у последњих 12 h. По завршетку култивације привидни вискозитет медијума са ефлуентима индустрије белог вина износио је 63,12 mPa·s. Са друге стране, код медијума који је у својој основи садржао отпадне воде генерисане током производње розе вина уочено је значајно повећање привидног вискозитета од самог почетка мерења, а овај веома интензиван тренд одржан је до краја извођења производног поступка ( $p<0,001$ ). У 36 h култивације привидни вискозитет наведеног медијума износио је 24,31 mPa·s, док је његова вредност у 120 h била 169,40 mPa·s. И без статистичке потврде очигледно је да су се култивационе течности добијене по завршетку биопроцеса значајно разликовале у погледу привидног вискозитета.



Слика 5.8. Промена привидног вискозитета медијума чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина током биосинтезе ксантана

Изузетно велики привидни вискозитет медијума на бази отпадних токова из производње розе вина може бити последица продукције значајне количине ксантана и/или биосинтезе макромолекула веома добрих реолошких карактеристика. Стога је изведена процена успешности производње овог биополимера на намешаним отпадним водама винарија и то на основу количине издвојеног ксантана, степена конверзије супстрата у жељени производ, као и укупне конверзије свих важних нутријената. Добијени резултати статистички су обрађени (део 4.7) и приказани у табели 5.12.

Резултати дати у поменутој табели показују да је на медијуму са отпадним водама из производње розе вина у примењеним условима остварена значајно већа продукција ксантана ( $p<0,001$ ) што је и претпостављено на основу драстичне промене његовог реолошког понашања (слика 5.8). По завршетку биопроцеса поменути медијум садржао је 30,64 g/l биосинтетисаног ксантана, док је из медијума на бази отпадних токова који се генеришу током производње белог вина издвојено 20,92 g/l биополимера. Познато је да реферетни сој, који је коришћен и у оквиру ових истраживања, на полусинтетичкој подлози са 50 g/l глукозе, у зависности од садржаја азота, продукује ксантан у количини од 19,99 до 39,72 g/l (Lo et al., 1997). Узимајући у обзир да се количина биополимера коју су култивационе течности садржале по завршетку биосинтезе налазила у наве-

деном опсегу, као и то да су се испитивани медијуми значајно разликовали у погледу почетног садржаја азотних компоненти (слика 5.7), добијени резултати су у складу са наведеним литературним подацима. Овим је потврђено да фактори који изазивају варијабилност састава сировина у великој мери утичу на успешност биосинтезе ксантана (López et al., 2001).

Табела 5.12. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина

Отпадна вода	P (g/l)*	K <sub>P/S</sub> (%)*	K <sub>S</sub> (%)*	K <sub>N</sub> (%)*	K <sub>P</sub> (%)*
бело вино	20,92±0,66 <sup>a</sup>	40,23±0,67 <sup>a</sup>	63,53±2,01 <sup>a</sup>	36,32±0,11 <sup>b</sup>	79,16±0,29 <sup>b</sup>
розе вино	30,64±0,50 <sup>b</sup>	60,73±0,46 <sup>b</sup>	78,91±0,38 <sup>b</sup>	33,13±1,05 <sup>a</sup>	36,67±0,63 <sup>a</sup>

\* Вредности у једној колони обележене истим словима налазе се на истом нивоу значајности у интервалу поверења од 95% (Данканов тест вишеструких поређења).

Према резултатима приказаним у табели 5.12. степен конверзије извора угљеника у ксантан за медијум који је у својој основи садржао ефлуенте индустрије розе вина износио је 60,73% што је у складу са вредностима које се остварују на индустријском нивоу (Palaniraj and Jayaraman, 2011). Са друге стране, у медијуму на бази отпадних вода из производње белог вина конвертовано је значајно мање шећера у биополимер ( $p < 0,001$ ), односно само 40,23%. Добијени резултати указују да је током производње ксантана на течним ефлуентима индустрије белог вина метаболисани шећер углавном утрошен за умножавање биомасе и задовољење енергетских потреба, док је извођењем истог производног поступка на отпадним токовима из производње розе вина поменути нутријент у већој мери искоришћен за биосинтезу жељеног производа. Ово потврђују вредности привидног вискозитета медијума (слика 5.8), као и количине издвојеног ксантана.

Током биосинтезе ксантана на намешаним отпадним водама које се генеришу приликом производње белог и розе вина остварена је значајно различита укупна конверзија редукујућих шећера ( $p < 0,001$ ). Вредности овог параметра за наведене медијуме износили су 63,53% и 78,91%, редоследом (табела 5.12). Већа количина метаболисаног шећера у медијуму са ефлуентима индустрије розе вина може бити последица присуства комерцијалне глукозе и фруктозе које су додате како би се постигао жељени почетни садржај шећера, а да би се одржао однос ферментабилних шећерних компоненти присутан у овим отпадним токовима (Mosse et al., 2011).

Резултати приказани у табели 5.12. указују да су се вредности конверзија укупног азота и фосфора статистички значајно разликовале између испитиваних медијума ( $p = 0,006$  и  $p < 0,001$ , редоследом). Остварене конверзије наведених нутријената за култивациони медијум на бази отпадних вода из производње белог вина износиле су 36,32% и 79,16%, редоследом, док су вредности истих параметара за медијум са течним ефлуентима из производње розе вина били 33,13% и 36,67%, редоследом. Значајно веће вредности конверзије оба лимитирајућа нутријента у отпадним токовима индустрије белог вина могу бити узрок мање продукције ксантана на медијуму чија су основа управо ови ефлуенти. Поред тога, веома висока вредност конверзије укупног фосфора остварена у наведеном медијуму указује да се намешавањем отпадних вода генерисаних током припреме шире за производњу белог вина добијају култивациони медијуми у којима се током производње ксантана остварује приметно већа потрошња фосфорних компоненти него на појединачним отпадним токовима (табела 5.6) што је веома важно ако се посматра из угла заштите животне средине.

С обзиром да је производња ксантана на индустријским ефлуентима предмет дугогодишњих истраживања, могућност његове биосинтезе потврђена је на различитим отпадним токовима, а у зависности од карактеристика које поседују временом су се формирале две групе сировина. Једну групу чине отпадни токови које је приликом припреме медијума за биосинтезу ксантана неопходно обогатити, и то најчешће изворима угљеника, азота и фосфора (Kalogiannis et al., 2003; Li et al., 2016). Будући да цена састојака медијума учествује у укупним трошковима биотехнолошке производње са значајним уделом (Додић и сар., 2015), посебна пажња посвећена је агроиндустријским ефлуентима који не захтевају додатно обогаћивање. Међутим, већина ових сировина се не може употребити као производни медијум без киселинског, базног и/или ензимског предтретмана (Khosravi-Darani et al., 2011) што, такође, у великој мери поскупљује производни процес. Основна карактеристика отпадних токова винарија код којих се бистрење шире врши флотацијом јесте то што се не могу сврстати ни у једну од поменутих група због чега су значајно исплативије сировине за биосинтезу ксантана у односу на ефлуенте настале у винаријама где се за бистрење шире користи таложење. Иако је у претходно изведеним огледима утврђено да се култивацијом одабраног производног соја на намешаним отпадним водама од прања муљаче, пресе и танка након бистрења шире флотацијом остварује мања продукција биополимера него на другом испитиваном медијуму, економски аспект биотехнолошке производње указује да су наведени ефлуенти веома вредни супстрати са огромним потенцијалом примене у предложеном производном поступку. Томе претходе додатна истраживања која обухватају оптимизацију најзначајнијих фактора који утичу на успешност производње ксантана.

#### **5.4. Формулација састава медијума за биосинтезу ксантана чија су основа отпадне воде винарија**

Успешност биосинтезе ксантана у великој мери зависи од састава култивационог медијума, што је потврђено и током ових истраживања. Због тога се у конкретним условима производње примењују медијуми претходно оптимизованог састава. Овај поступак подразумева процену утицаја појединих састојака на количину и квалитет жељеног производа, а затим и тачно дефинисање концентрација оних који су се показали као најзначајнији (Waites et al., 2001). Поред остваривања високе продукције ксантана одговарајућих реолошких карактеристика, приликом формулације производног медијума у обзир се морају узети и техно-економски параметри (Kurbanoglu and Kurbanoglu, 2007). Како се у производњи овог изузетног биополимера све више примењују супстрати ниске тржишне вредности, економски захтеви оптимизације су задовољени, а стабилност биопроцеса са предвидивим исходом загарантована је стандардизацијом припреме медијума. Правилна припрема култивационих медијума на бази комплексних сировина неједначеног састава обухвата њихову анализу у погледу количина оних компоненти које утичу на успешност одабраног производног процеса, док се наредни кораци изводе на основу добијених резултата према унапред дефинисаној рецептури. Квалитет култивационог медијума припремљеног са сваком новом серијом ефлуената обавезно се проверава извођењем биопроцеса у лабораторијским условима (Савић, 2007).

На основу резултата огледа изведених током претходних фаза истраживања утврђено је да су отпадне воде од прања муљаче, пресе и танка након бистрења шире флотацијом најпогоднији супстрати за биотехнолошку производњу ксантана које индустрија вина генерише на нашој територији. Поступак припреме култивационих медијума на бази наведених сировина је релативно једноставан, а подразумева њихово намешавање, додатак калцијум-карбоната као средства за пуферовање, одговарајућу корекцију вредности рН и стерилизацију. С обзиром да високе концентрације супстрата инхибирају раст производног микроорганизма, а самим тим и

биосинтезу жељеног секундарног метаболита (Ghashghaei et al., 2016), циљ намешавања течних ефлуената који настају приликом производње шире је постизање оптималног почетног садржаја шећерних компоненти.

Почетна концентрација извора угљеника у медијуму за производњу ксантана варира у зависности од типа супстрата и трајања биопроцеса, а у вредности до 50 g/l не утиче негативно на метаболичку активност производне културе (Leela and Sharma, 2000; Dodić et al., 2011). Стога су отпадне воде које се генеришу током припреме шире за производњу белог, али и розе вина намешане тако да иницијално садрже 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l и 50 g/l шећера (део 4.2), док је култивација референтног соја на наведеним подлогама изведена при идентичним условима (део 4.4). Како би се утврдило да је метаболичка активност одабране производне културе резултирала биосинтезом ксантана, по завршетку биопроцеса вршена су реолошка мерења. Добијени подаци фитовани су степеним законом при чему су одређене вредности индекса тока и фактора конзистенције на основу којих је израчунат привидни вискозитет медијума (део 4.6.2). Одступања измерених од функцијом предвиђених вредности процењена су на основу коефицијента детерминације.

Дефинисање почетног садржаја шећера у медијумима на бази отпадних вода винарија извршено је применом класичних статистичких тестова (део 4.7), а на основу утицаја испитиваног фактора на количину биосинтетисаног ксантана, резидуални садржај шећерних компоненти, молекулску масу биополимера и привидни вискозитет његових раствора. Поред постизања максималне продукције ксантана што бољег квалитета, који су основни показатељи успешности овог биотехнолошког процеса (Roseiro et al., 1992), веома значајан критеријум за дефинисање састава медијума је и концентрација неискоришћеног шећера (Rončević et al., 2014). Будући да шећерне компоненте које производни микроорганизам не утроши током култивације након рециклирања растварача употребљеног за издвајање производа остају у отпадној цибри и представљају губитак са економског, али и еколошког становишта, резидуалан садржај шећера у култивационој течности треба да буде минималан. Коначан одабир медијума, који ће се користити у наставку истраживања за унапређење предложеног производног поступка, извршен је статистичким поређењем вредности наведених параметара добијених након изведене биосинтезе ксантана на намешаним отпадним токовима из производње белог, односно розе вина са почетним садржајем шећера при којем се, у примењеним условима, остварује највећа могућа успешност биопроцеса.

#### **5.4.1. Формулација састава медијума за биосинтезу ксантана чија су основа отпадне воде из производње белог вина**

Могућност биосинтезе ксантана на намешаним отпадним водама индустрије белог вина са различитим почетним концентрацијама шећера проверена је на основу реолошког понашања медијума по завршетку биопроцеса. Веома високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,996$ ) указују на изузетно поклапање измерених вредности са степеним законом, док су карактеристични реолошки параметри дати у табели 5.13. Вредности фактора конзистенције и привидног вискозитета медијума налазиле су се у опсегу од  $0,1603 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  до  $0,7374 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ , односно од  $14,47 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  до  $41,78 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , редоследом, а указују да је метаболичка активност одабраног производног соја резултирала различитом променом реологије система. Са друге стране, како је индекс тока анализираних култивационих течности имао вредности од 0,5173 до 0,4238 доказан је псеудопластичан тип протицања. Сва ова запажања поуздани су показатељи продукције жељеног биополимера.

Табела 5.13. Реолошке карактеристике медијума са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње белог вина по завршетку биосинтезе ксантана

$S_0$ (g/l)	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	$\eta_a$ (mPa·s)
10	0,4429	0,5507	34,32±1,29
20	0,4238	0,7374	41,78±1,64
30	0,4618	0,4237	29,01±1,19
40	0,4814	0,2995	22,61±0,96
50	0,5173	0,1603	14,47±0,77

С обзиром да резултати реолошких мерења указују да је на свим испитиваним медијумима дошло до биосинтезе ксантана, потребно је утврдити на којем од њих се остварује највећа ефикасност. Стога је изведена једнофакторијална анализа варијансе експерименталних података којом је, и у интервалу поверења од 95%, утврђен утицај почетног садржаја шећера на одабране показатеље успешности испитиваног биопроцеса. Добијени резултати дати су у табели 5.14.

Табела 5.14. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње белог вина

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
P (g/l)	$S_0$ (g/l)	14,673	4	3,668	33,558	0,000009
	грешка	1,093	10	0,109		
S (g/l)	$S_0$ (g/l)	1169,785	4	292,446	387,124	< 0,000001
	грешка	7,554	10	0,755		
$M_w$ (10 <sup>5</sup> g/mol)	$S_0$ (g/l)	5,586	4	1,396	63,750	< 0,000001
	грешка	0,2190	10	0,022		
$\eta_a^p$ (mPa·s)	$S_0$ (g/l)	833,525	4	208,381	126,070	< 0,000001
	грешка	16,529	10	1,653		

Резултати приказани у табели 5.14. показују да постоје статистички значајне разлике између испитиваних медијума у погледу количине биосинтетисаног ксантана, резидуалног садржаја шећера и квалитета издвојеног биополимера ако се као извор варијабилитета посматра почетна концентрација шећерних компоненти. Ово доказују изузетно ниске p-вредности за све одабране параметре којима се описује успешност изведеног производног поступка. Будући да резултати основне статистичке анализе не указују тачно између којих вредности сваког од испитиваних параметара постоји значајна разлика, експериментални подаци обрађени су помоћу Данкановог теста вишеструких поређења, а добијени резултати дати су у табели 5.15. Овај статистички тест је врло ефикасан и због тога се често користи у практичном раду, а врши директно поређење средњих вредности различитих група унутар популације. Како разлика између тестираних вредности мора бити велика да би била статистички значајна (Чобановић и сар., 2003), примена Данкановог теста у биотехнолошкој производњи је оправдана.



Табела 5.15. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње белог вина

S <sub>0</sub> (g/l)	P (g/l)*	Fru (g/l)	Glu (g/l)	S (g/l)*	M <sub>w</sub> (10 <sup>5</sup> g/mol)*	η <sub>aP</sub> (mPa·s)*
10	9,60±0,16 <sup>a</sup>	0,15±0,09	0,00**	0,15±0,09 <sup>a</sup>	4,25±0,15 <sup>e</sup>	37,73±1,48 <sup>e</sup>
20	11,10±0,31 <sup>b</sup>	4,70±0,21	0,00**	4,70±0,21 <sup>b</sup>	3,83±0,19 <sup>d</sup>	29,65±1,38 <sup>d</sup>
30	12,02±0,48 <sup>c</sup>	7,49±0,44	0,00**	7,49±0,44 <sup>c</sup>	3,46±0,13 <sup>c</sup>	26,10±1,42 <sup>c</sup>
40	12,13±0,35 <sup>c</sup>	10,77±0,74	7,73±0,53	18,50±1,27 <sup>d</sup>	3,17±0,12 <sup>b</sup>	22,22±1,14 <sup>b</sup>
50	12,20±0,28 <sup>c</sup>	13,87±0,69	9,93±0,70	23,81±1,39 <sup>e</sup>	2,45±0,14 <sup>a</sup>	15,38±0,92 <sup>a</sup>

\* Вредности у једној колони обележене истим словима налазе се на истом нивоу значајности у интервалу поверења од 95% (Данканов тест вишеструких поређења)

\*\* Није детектовано

Литературни наводи упућују да се са повећањем иницијалног садржаја извора угљеника метаболичком активношћу одабраног производног соја добијају култивационе течности са већом количином биосинтетисаног ксантана (Salah et al., 2010; Dodić et al., 2013). Међутим, за сваки сој, у зависности од одабраног извора угљеника и конкретних услова производње, може се дефинисати критична концентрација поменутог нутријента изнад које не долази до значајније продукције жељеног биополимера (El Enshasy et al., 2011). Резултати добијени у оквиру ових истраживања у складу су са наведеним литературним подацима (табела 5.15). Дакле, са порастом почетне концентрације редукујућих шећера у медијумима на бази течних ефлуената индустрије белог вина од 10 g/l до 50 g/l уочено је повећање садржаја биосинтетисаног ксантана од 9,60 g/l до 12,20 g/l при чему је оно било статистички значајно до концентрације извора угљеника од 30 g/l ( $p < 0,001$ ). По завршетку биопроцеса из медијума овако дефинисаног састава издвојено је 12,02 g/l биополимера. Са повећањем садржаја шећерних компоненти од 30 g/l до 40 g/l, па чак и 50 g/l нису примећене статистички значајне разлике у погледу количине ксантана у култивационим течностима што доказују  $p$ -вредности од 0,701 и 0,546, редоследом. Иако су у питању комплексни медијуми, у којима се, због усвојеног начина припреме, са порастом концентрације шећера повећава и садржај других компоненти од којих неке могу деловати инхибиторно на метаболизам производног соја, ни у једном од њих није уочен негативан утицај мањег разблажења коришћених отпадних токова на успешност биопроцеса. С обзиром да се поменута запажања разликују од резултата других аутора према којима се у концентрованијим супстратима значајно смањује продуктивност одабране производне културе (Li et al., 2016), још једном се може истаћи потенцијал отпадних вода винарија као сировина за биотехнолошку производњу ксантана.

Резултати приказани у табели 5.15. указују да је по завршетку биопроцеса у култивационим течностима заостала одређена количина шећера (од 0,15 g/l до 23,81 g/l) која се значајно повећавала уколико су за производњу ксантана коришћени медијуми богатији овим нутријентом ( $p < 0,001$ ). Ако се као показатељ успешности биосинтезе поменутог микробиолошког полисахарида узме резидуалан садржај шећерних компоненти, евидентно је да су медијуми са 10 g/l, 20 g/l и 30 g/l извора угљеника најпогоднији за примену у предложеном производном поступку. Поред тога, интересантно је приметити да су се неискоришћене количине фруктозе и глукозе веома разликовале међу медијумима. Ово се може објаснити чињеницом да култивација бактерија рода *Xanthomonas* на подлози која као извор угљеника садржи еквимоларну смешу глукозе и неког другог шећера резултира веома интензивном потрошњом глукозе, док се друга шећерна компонента троши у много мањој мери (Zhang and Chen, 2010). Премда се фруктоза не сматра најпогоднијим извором угљеника за производњу ксантана (Leela and Sharma, 2000), доказано је да је одличан стимулатор биосинтезе овог микробиолошког полисахарида на ста-

ндардној полусинтетичкој подлози са глукозом (Souw and Demain, 1979). Будући да су поменуте шећерне компоненте састојци течних ефлуената које генерише индустрија вина, јасно је зашто се управо на овим отпадним токовима остварује изузетна продукција жељеног биополимера.

Квалитет ксантана биосинтетисаног у примењеним условима процењен је на основу средње молекулске масе биополимера и привидног вискозитета његових раствора. На основу резултата приказаних у табели 5.15. уочава се да је одабрани производни сој продуковао ксантан највећих молекулских маса ( $4,25 \cdot 10^5$  g/mol) када су отпадне воде из производње белог вина намешане тако да иницијално садрже 10 g/l редукујућих шећера. Такође, може се приметити да је вредност овог показатеља квалитета биополимера значајно опадала са повећањем почетне концентрације шећерних компоненти ( $p < 0,001$ ) због чега је молекулска маса ксантана произведеног на медијуму са 50 g/l шећера износила  $2,43 \cdot 10^5$  g/mol. Негативан утицај повећања садржаја шећера у култивационом медијуму на вредност молекулске масе овог микробиолошког полисахарида уочили су и други аутори (Kalogiannis et al., 2003). Без обзира што се молекулска маса комерцијалног ксантана најчешће налази у опсегу од  $3,00 \cdot 10^7$  g/mol до  $5,00 \cdot 10^7$  g/mol (Li et al., 2016), биополимери произведени на различито намешаним отпадним водама из производње белог вина уобичајеног су квалитета за сирови ксантан биосинтетисан истим производним сојем (Rončević et al., 2014).

С обзиром да вискозитет раствора ксантана познатих концентрација не зависи само од његове молекулске масе већ и од разгранатости структуре, односно од састава макромолекула и расподеле пируватних и ацетатних група (Reis et al., 2010), велики број аутора користи управо вредност овог параметра за процену квалитета биополимера синтетисаног у конкретним условима, али и за разматрање могућности његове практичне примене (Nery et al., 2013). Стога је у оквиру ових истраживања одређен и привидан вискозитет раствора ксантана издвојених из медијума са различитим почетним концентрацијама шећера чија су основа течни ефлуенти индустрије белог вина. Добијени резултати приказани су у табели 5.15, а показују да квалитет синтетисаног биополимера значајно опада са повећањем садржаја извора угљеника у култивационом медијуму ( $p < 0,001$ ). Дакле, ксантан чији су раствори највискознији ( $\eta_a = 37,73$  mPa·s) по завршетку биопроцеса издвојен је из медијума са 10 g/l редукујућих шећера, док су раствори биополимера продукованог на намешаним отпадним водама индустрије белог вина са 50 g/l шећерних компоненти били значајно мање вискозни ( $\eta_a = 15,38$  mPa·s). Поређењем вредности оба показатеља квалитета биополимера потврђено је да је молекулска маса ксантана у директној вези са привидним вискозитетом његових раствора (Brandão et al., 2013).

Током ове фазе истраживања утврђено је да је висока продуктивност производног соја осигурана присуством веће количине шећерних компоненти што, са друге стране, негативно утиче на квалитет синтетисаног биополимера. Стога је приликом дефинисања састава медијума за биотехнолошку производњу ксантана чија су основа отпадне воде из производње белог вина потребно наћи компромисно решење. Анализом резултата приказаних у табели 5.15. као најпогоднији медијум одабран је онај у коме је почетни садржај редукујућих шећера 30 g/l. Иако на овом медијуму референтни сој производи подједнаку количину ксантана као и на концентрованије намешаним ефлуентима, неискоришћени шећер који заостаје у култивационој течности много је мањи, док је издвојени биополимер значајно квалитетнији. Формулација састава култивационог медијума за производњу ксантана била је предмет истраживања великог броја аутора због чега се у литератури могу пронаћи различити подаци. Међутим, ако се за биосинтезу ксантана користи полусинтетичка подлога са глукозом (Funahashi et al., 1987), меласа (Gilani et al., 2011b) или медијум на бази скробног агроиндустријског отпада (Li et al., 2012), препоручена почетна концентрација извора угљеника за постизање максималне успешности овог биопроцеса је 30 g/l што је добијено и у овим истраживањима.

### 5.4.2. Формулација састава медијума за биосинтезу ксантана чија су основа отпадне воде из производње розе вина

Истовремено са претходним огледима изведен је готово идентичан сет експеримената у којем су као сировине за припрему култивационих медијума коришћене отпадне воде из производње розе вина. Како би се проверила могућност биосинтезе ксантана на овим супстратима по завршетку биопроцеса испитана је реологија система. Високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,994$ ) указују на адекватно фитовање мерених вредности очитаних са ротационог вискозиметра жељеним моделом, а дефинисани реолошки параметри и израчунати привидни вискозитети дати су у табели 5.16. Приказани резултати указују на неједнако реолошко понашање испитиваних медијума по завршетку биопроцеса. Ово потврђују различите вредности фактора конзистенције (од  $0,1850 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  до  $0,8936 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ ) и привидног вискозитета (од  $11,42 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  до  $40,02 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ), док је на основу индекса тока, чије су се вредности налазиле у интервалу од  $0,4410$  до  $0,3766$ , доказан псеудопластичан тип протицања свих култивационих течности што је несумњиви показатељ производње биополимера.

Табела 5.16. Реолошке карактеристике медијума са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње розе вина по завршетку биосинтезе ксантана

$S_0$ (g/l)	$n$ (1)	$K$ ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ )	$\eta_a$ ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ )
10	0,4039	0,6489	$33,29 \pm 1,00$
20	0,3766	0,8936	$40,02 \pm 1,49$
30	0,4217	0,3547	$19,89 \pm 1,31$
40	0,4364	0,2471	$14,91 \pm 1,02$
50	0,4410	0,1850	$11,42 \pm 0,52$

Будући да резултати реолошких одређивања указују да је на свим испитиваним медијумима у примењеним условима могуће произвести ксантан, изведена је једнофакторијална анализа варијансе како би се са поузданошћу од 95% утврдило при којој почетној концентрацији шећера се остварује жељена ефикасност овог биотехнолошког процеса. Резултати статистичке обраде података приказани су у табели 5.17

Табела 5.17. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње розе вина

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	$p$ -вредност
$P$ (g/l)	$S_0$ (g/l)	19,457	4	4,864	85,663	$< 0,000001$
	грешка	0,568	10	0,057		
$S$ (g/l)	$S_0$ (g/l)	1625,323	4	406,331	333,687	$< 0,000001$
	грешка	12,177	10	1,218		
$M_w$ ( $10^5$ g/mol)	$S_0$ (g/l)	9,376	4	2,344	131,963	$< 0,000001$
	грешка	0,178	10	0,018		
$\eta_a^P$ ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ )	$S_0$ (g/l)	1142,660	4	285,665	122,788	$< 0,000001$
	грешка	23,265	10	2,326		

Резултати представљени у табели 5.17. потврђују претходно дефинисане зависности, односно показују да количина шећера доступна производном соју на почетку биосинтезе статистички

значајно утиче на његову метаболичку активност, а самим тим и успешност испитиваног биопроцеса. Ово доказују изузетно ниске  $p$ -вредности за количину издвојеног ксантана, садржај неискоришћених шећерних компоненти и параметара на основу којих је процењен квалитет синтетисаног биополимера. С обзиром да резултати једнофакторијалне анализе варијансе не указују тачно између којих вредности сваког од испитиваних показатеља успешности биосинтезе ксантана постоји статистички значајна разлика, експериментални подаци обрађени су помоћу Данкановог теста вишеструких поређења. Резултати примењеног постериори поступка приказани су у табели 5.18.

Табела 5.18. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима са различитим садржајем шећера чија су основа отпадне воде из производње розе вина

$S_0$ (g/l)	P (g/l)*	Fru (g/l)	Glu (g/l)	S (g/l)*	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*	$\eta_{sp}$ (mPa·s)*
10	8,90±0,31 <sup>a</sup>	0,19±0,12	0,00**	0,19±0,12 <sup>a</sup>	5,13±0,11 <sup>e</sup>	45,84±1,91 <sup>e</sup>
20	10,13±0,16 <sup>b</sup>	4,69±0,71	0,00**	4,69±0,71 <sup>b</sup>	4,41±0,13 <sup>d</sup>	35,56±1,62 <sup>d</sup>
30	11,49±0,25 <sup>c</sup>	7,92±0,90	0,00**	7,92±0,90 <sup>c</sup>	3,59±0,15 <sup>c</sup>	27,96±1,74 <sup>c</sup>
40	11,65±0,26 <sup>c</sup>	10,54±0,95	8,64±0,72	19,18±1,26 <sup>d</sup>	3,25±0,12 <sup>b</sup>	24,89±1,20 <sup>b</sup>
50	11,91±0,19 <sup>c</sup>	15,79±12,97	12,97±0,74	28,76±1,78 <sup>e</sup>	2,99±0,16 <sup>a</sup>	21,35±0,93 <sup>a</sup>

\* Вредности у једној колони обележене истим словима налазе се на истом нивоу значајности у интервалу поверења од 95% (Данканов тест вишеструких поређења)

\*\* Није детектовано

Анализом резултата приказаних у табели 5.18. може се уочити да су се по завршетку биосинтезе ксантана на отпадним токовима индустрије розе вина намешаним тако да садрже од 10 g/l до 50 g/l шећера добиле култивационе течности са концентрацијом ксантана од 8,90 g/l до 11,91 g/l. Међутим, издвојена количина жељеног производа статистички значајно се повећавала са порастом концентрације шећерних компоненти до 30 g/l ( $p < 0,001$ ). На подлози овако дефинисаног састава референтни сој је, у примењеним условима, биосинтетисао 11,49 g/l ксантана, што се није статистички значајно разликовало у односу на продукцију биополимера која је остварена на медијумима са 40 g/l и 50 g/l редукујућих шећера. Ово поткрепљују  $p$ -вредности од 0,430 и 0,066, редоследом. Идентична зависност почетног садржаја шећера и количине биосинтетисаног ксантана примењена је и када су се као основе производног медијума користиле отпадне воде из производње белог вина (табела 5.15). Осим тога, ни у намешаним ефлуентима који се генеришу приликом припреме шире за производњу розе вина није забележен негативан утицај смањеног степена разблажења на метаболичку активност одабраног производног соја који је карактеристичан за поједине отпадне токове (López et al., 2001; Li et al., 2016).

Резидуалан садржај шећерних компоненти у култивационим течностима које су добијене по завршетку биосинтезе ксантана у примењеним условима кретао се од 0,19 g/l до 28,76 g/l (табела 5.18), а статистички значајно се повећавао са порастом њихове иницијалне концентрације ( $p < 0,001$ ). Посматрајући ове резултате са економског и еколошког становишта биотехнолошке производње очигледно је да су медијуми са 10 g/l, 20 g/l и 30 g/l редукујућих шећера најадекватнији за примену у испитиваном биопроцесу. Иако су коришћене отпадне воде из производње розе вина садржале подједнаке количине глукозе и фруктозе (табела 5.3), концентрација поменутих шећера која није утрошена током производног поступка приметно се разликовала међу култивационим медијумима. Ово је детектовано и у медијумима на бази течних ефлуената индустрије белог вина (табела 5.15), а у складу је са литературним подацима који наводе да ве-

ћина производних микроорганизама, па тако и бактерије рода *Xanthomonas*, из смеше више различитих извора угљеника најлакше усвајају и метаболишу глукозу (Zhang and Chen, 2010; El Enshasy et al., 2011).

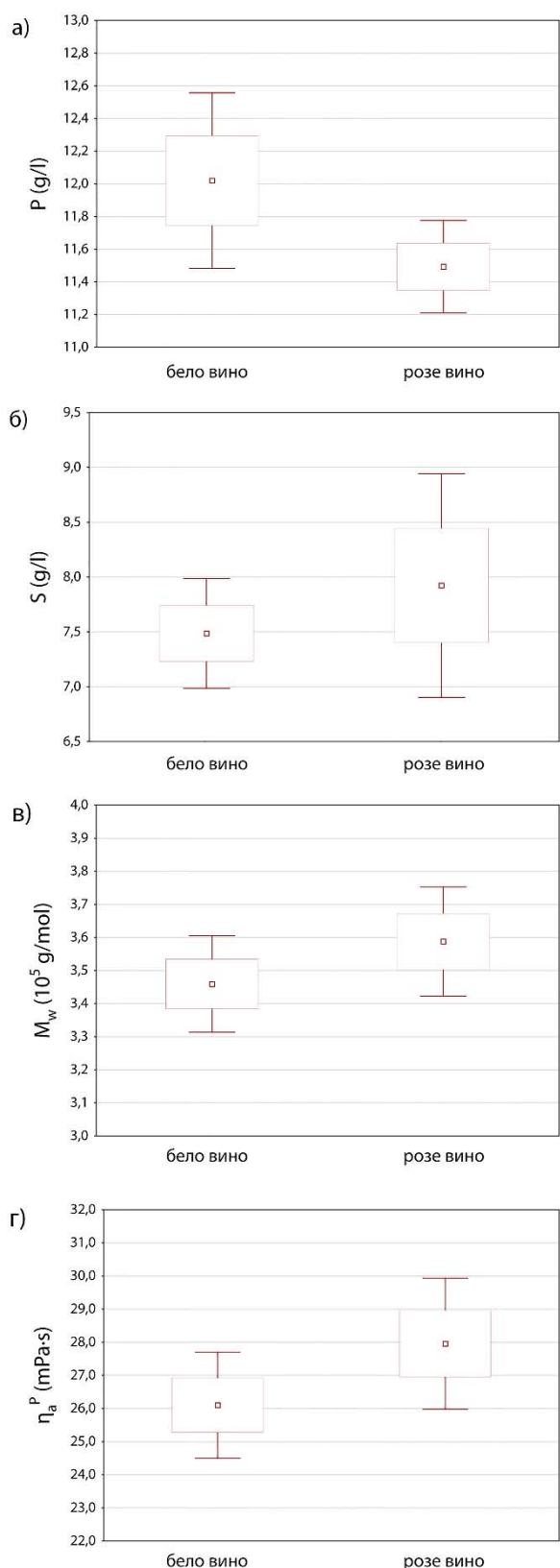
Утицај састава подлоге на молекулску масу ксантана који је утврђен анализом биополимера синтетисаног на различито намешаним отпадним водама из производње белог вина (табела 5.15) забележен је и када су као основе култивационог медијума коришћени течни ефлуенти индустрије розе вина (табела 5.18), а доказан је и током ранијих истраживања (Kalogiannis et al., 2003). Дакле, ксантан највећих молекулских маса ( $5,13 \cdot 10^5$  g/mol) произведен је на медијуму са 10 g/l редукујућих шећера, док је са повећањем почетног садржаја поменутих нутријената квалитет синтетисаног биополимера значајно опадао ( $p < 0,001$ ). Због тога је по завршеној биосинтези из култивационе течности која је иницијално садржала 50 g/l шећерних компоненти издвојен ксантан много мање молекулске масе ( $2,99 \cdot 10^5$  g/mol). Такође, важно је напоменути да молекулске масе ксантана биосинтетисаних на отпадним токовима из производње розе вина имају вредности карактеристичне за овај степен пречишћености биополимера (Rončević et al., 2014).

Резултати приказани у табели 5.18. показују да привидни вискозитет раствора биополимера издвојених из култивационих медијума на бази отпадних вода индустрије розе вина значајно опада са повећањем почетне концентрације редукујућих шећера ( $p < 0,001$ ) што је доказано и када су за биосинтезу коришћени течни ефлуенти генерисани у различитим фазама производње белог вина (табела 5.15). Највећи привидни вискозитет (45,84 mPa·s) показао је раствор ксантана којег је примењени производни сој продуковао на медијуму са 10 g/l шећерних компоненти, док је на намешаним отпадним токовима са садржајем шећера од 50 g/l синтетисан биополимер чији су раствори најмање вискозни (21,35 mPa·s). Овим је потврђена директна корелација молекулске масе ксантана и вискозитета његових раствора (Brandão et al., 2013).

Вредности одабраних показатеља успешности испитиваног биопроцеса јасно указују да се за остваривање жељене ефикасности предложеног производног поступка састав медијума на бази отпадних вода из производње розе вина мора пажљиво формулисати. Имајући у виду све захтеве биотехнолошке производње почетна концентрација шећера од 30 g/l дефинисана је као најпогоднија за биосинтезу ксантана у примењеним условима. Ово је добијено и у претходно анализираним огледима, али и у истраживањима других аутора у којима је производња жељеног биополимера изведена на традиционално примењиваној полусинтетичкој подлози са глукозом (Funahashi et al., 1987), као и медијумима на бази меласе (Gilani et al., 2011b) и скробног агроиндустријског отпада (Li et al., 2012).

#### 5.4.3. Поређење успешности биосинтезе ксантана на медијумима оптималне формулације

Како би се између медијума на бази отпадних вода винарија претходно формулисаних састава одабрао онај који ће се користити у наставку истраживања за унапређење испитиваног биотехнолошког процеса, показатељи успешности биосинтезе ксантана представљени су правоугаоним дијаграмима (слика 5.9. а-г). Овакав начин графичког приказивања статистички обрађених података нарочито је погодан за прелиминарно поређење узорака из две посматране популације, а тиме и самих популација (Јевремовић, 2009). Анализом степена дистрибуције вредности одабраних параметара утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у погледу количине биосинтетисаног ксантана, резидуалног садржаја шећерних компоненти, молекулске масе биополимера и привидног вискозитета његових раствора ако се као култивациони медијуми примењују намешани отпадни токови из различитих фаза производње белог и



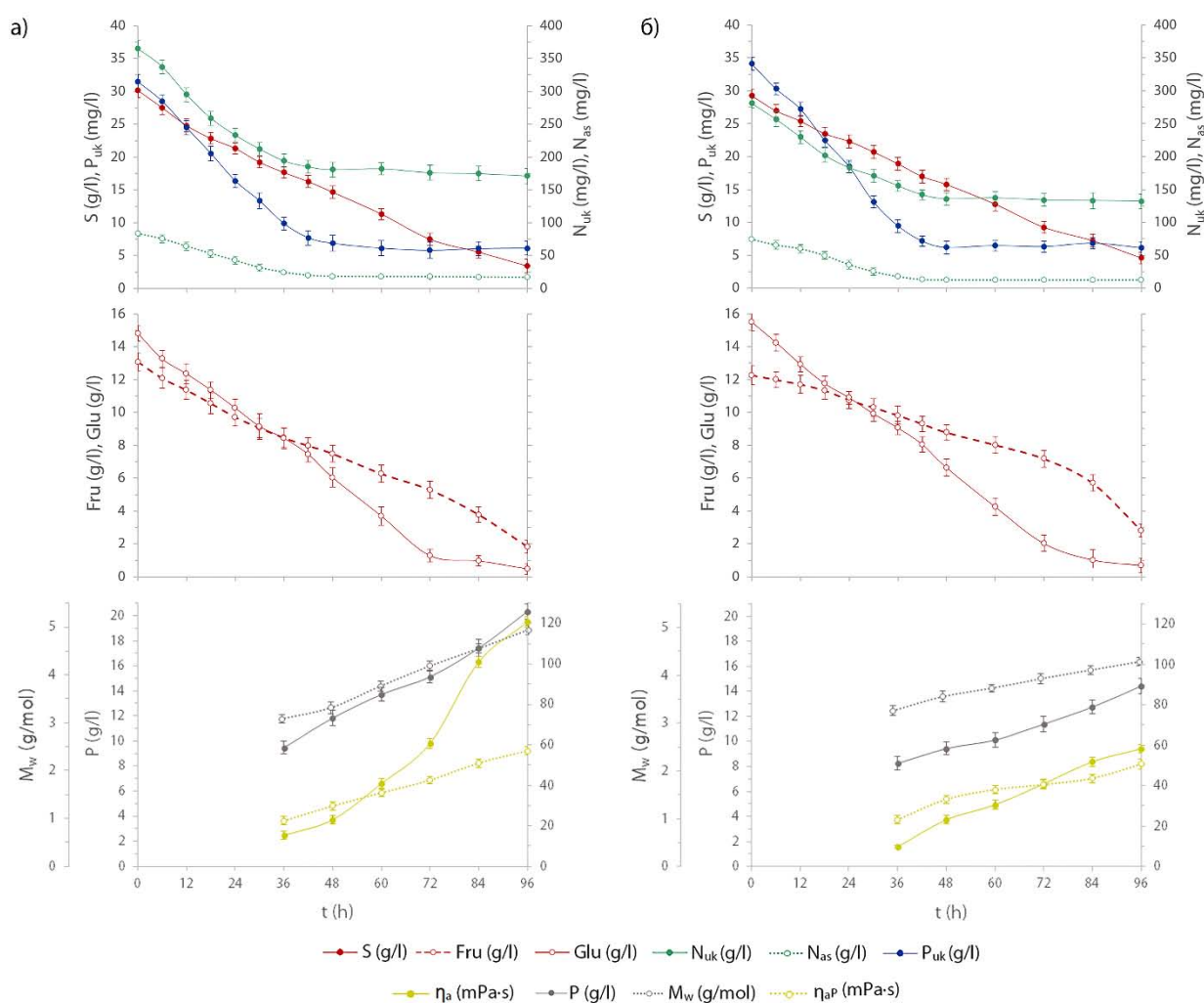
Слика 5.9. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава:

- садржај ксантана,
- резидуални садржај шећера,
- молекулска маса ксантана,
- вискозитет раствора ксантана

розе вина са 30 g/l редукујућих шећера. Ово доказују и резултати једнофакторијалне анализе варијансе (табела 8.5; Прилог 1), односно  $p$ -вредности од 0,165, 0,493, 0,317 и 0,226, редоследом. Будући да статистичким поређењем наведених параметара биосинтезе није установљена значајна разлика међу медијумима у погледу успешности извођења производног поступка у примењеним условима, потребна су додатна експериментална испитивања како би се издвојио супстрат погоднијег састава. Међутим, сама чињеница да су добијени веома слични резултати указује да се у недостатку једне воде успешно може користити и друга што је веома важно када се разматра индустријализација предложеног производног поступка.

Познато је да се извођењем биопроцеса у већим запреминама и интензивнијим условима аерације и мешања метаболичка активност производне културе убрзава што резултује већом продукцијом биополимера (El Enshasy et al., 2011; Nery et al., 2013). Међутим, када се за биотехнолошку производњу ксантана примењују комплексни медијуми чија су основа различити индустријски ефлуенати, без обзира на погодне услове средине и оптималан садржај најважнијих нутријената, метаболизам бактерија рода *Xanthomonas* може да се одвија неједнаким интензитетом због чега је могуће уочити значајне разлике у приносу и квалитету коначног производа, као и степену искоришћења супстрата (Вајић et al., 2014). Стога је култивација референтног соја на течним ефлуентима индустрије белог и розе вина намешаним према претходно дефинисаној формулацији изведена у лабораторијском биореактору при контролисаним условима (део 4.4) у трајању од 96 h. Непосредно након промене вредности најзначајнијих процесних параметара уочено је пенушање обе култивационе течности које је сузбијено додатком антипенушавца, док је у каснијим фазама култивације вршена корекција вредности рН како би се поменути параметар одржао у оптималним границама (6,0-8,0) за постизање максималне продукције биополимера (Mirik et al., 2011).

Ток биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава испитан је анализом узорка култивационих течности у погледу садржаја шећерних компоненти, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора. Од момента промене услова у свим временима узорковања одређивана је и реологија медијума и количина синтетисаног биополимера, али и показатељи његовог квалитета (молекулска маса и привидни вискозитет раствора). Вредности наведених параметара за намешане отпадне воде из одабраних фаза производње белог и розе вина приказани су на слици 5.10. (а-б), редоследом.



Слика 5.10. Ток биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава чија су основа отпадне воде из производње белог (а) и розе (б) вина

Резултати приказани на слици 5.10. показују, а статистички тестови потврђују да се садржај редукујућих шећера у оба испитивана медијума смањивао значајним интензитетом током читавог трајања култивације ( $p < 0,001$ ). По завршетку биопроцеса у медијуму чија су основа отпадни токови из производње белог вина заостало је 3,44 g/l шећерних компоненти чиме је остварен степен конверзије извора угљеника од 88,56%, док је у намешаним ефлуентима индустрије розе вина резидуалан садржај ових нутријената износио 4,57 g/l услед чега је конвертовано 84,43% шећера из култивационе течности. Посматрано са економског становишта биотехнолошке производње количине шећера које нису искоришћене у испитиваном производном процесу су безначајне што је сигурна потврда да је састав оба медијума адекватно формулисан. Такође,

важно је истаћи да су се концентрације редукујућих шећера које су детектоване у култивационим течностима добијеним након успешно изведене биосинтезе у лабораторијском биореактору и судовима мање запремине међусобно статистички значајно разликовале ( $p < 0,001$  и  $p = 0,003$  за намешане отпадне воде из производње белог и розе вина, редоследом). Добијени резултати су у складу са литературним подацима да током култивације одабраног производног соја у интензивнијим условима, какви владају у биореактору, долази до брже, а самим тим и много веће потрошње доступних нутријената (Li et al., 2016).

С обзиром да су редукујући шећери фруктоза и глукоза главни извори угљеника у течним ефлуентима индустрије вина (Malandra et al., 2003), њихова потрошња током производње жељеног биополимера праћена је на основу промене садржаја редукујућих материја. Међутим, како су на основу резултата претходна два сета експеримената утврђене велике разлике у погледу резидуалног садржаја наведених шећерних компоненти (табеле 5.15. и 5.18), испитивање тока биосинтезе ксантана у овој фази истраживања обухватило је и детаљнију анализу узорака култивационих течности одговарајућом инструменталном методом (део 4.6.2). Очитани подаци и њихова статистичка обрада указују на веома различиту динамику потрошње појединачних шећера у оба испитивана медијума. У намешаним отпадним водама из производње белог вина (слика 5.10. а) значајно смањење садржаја глукозе трајало је до 72 h култивације ( $p < 0,001$ ). Како је током овог периода утрошена готово сва доступна количина поменутог шећера у наставку биопроцеса није детектована значајнија промена његовог садржаја ( $p = 0,089$ ). Веома сличан тренд промене концентрације глукозе забележен је и у намешаним отпадним токовима генерисаним приликом производње розе вина (слика 5.10. б). У овом медијуму значајна потрошња анализираниог шећера примећена је до 84 h ( $p < 0,001$ ) док у последњих 12 h култивације производном соју није била на располагању довољна количина поменутог нутријента за његову приметну промену ( $p = 0,413$ ). Са друге стране, иако је смањење садржаја фруктозе у намешаним отпадним водама винарија било статистички значајно током читавог трајања биопроцеса ( $p < 0,001$ ) оно није било толико интензивно у периоду значајне потрошње глукозе. Тек након исцрпљења супстрата глукозом забележена је интензивнија потрошња фруктозе у оба испитивана медијума. Наведене промене резултовале су значајно већим резидуалним садржајем фруктозе ( $p = 0,009$  и  $p = 0,003$  за намешане ефлуенте индустрије белог и розе вина, редоследом), а последица су лакшег и бржег асимиловања глукозе од стране одабране производне културе (Letisse et al., 2002). Исти резултати добијени су и у претходно изведеним огледима, као и у веома сличним истраживањима других аутора (Zhang and Chen, 2010). Поред тога, интересантно је споменути да се код оба медијума у свим временима узорковања укупан садржај шећера који је детектован савременом инструменталном методом није значајно разликовао од садржаја редукујућих материја што поткрепљују  $p$ -вредности дате у табелама 8.6. и 8.7. (Прилог 1). Исходи да се потрошња извора угљеника током биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија поуздано може пратити веома једноставном спектрофотометријском методом за одређивање садржаја редукујућих супстанци.

На основу резултата приказаних на слици 5.10. може се приметити да су се испитивани медијуми статистички значајно разликовали према количини лимитирајућих нутријената за умножавање биомасе коју су садржали на почетку биосинтезе ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,016$  и  $p = 0,038$  за укупан и асимилабилан азот, као и укупан форфор, редоследом). Имајући у виду њихов садржај у коришћеним сировинама (табеле 5.2. и 5.3), као и дефинисан начин припреме медијума, поменуте разлике су у складу са очекивањима. Међутим, и поред неједнаког састава култивационих медијума, статистичком обрадом експерименталних резултата утврђена је веома слична динамика промене садржаја нутријената одговорних за регулацију метаболичке активности производног соја.



Анализом добијених резултата (слика 5.10) доказано је да се концентрација укупног азота интензивно смањивала до 42 h ( $p < 0,001$ ), након чега се није значајно мењала до краја култивације што потврђују  $p$ -вредности од 0,179 и 0,290 за намешане отпадне воде генерисане током производње белог и розе вина, редоследом. Од почетних 365,00 mg/l и 281,33 mg/l, у наведеним медијумима заостало је 171,33 mg/l и 132,00 mg/l азотних једињења чиме је остварена конверзија од 53,10% и 53,12%, редоследом. Иако су се и неискоришћене количине укупног азота статистички значајно разликовале међу медијумима ( $p = 0,013$ ) готово идентични степени конверзије овог нутријента указују да је у намешаним ефлуентима индустрије белог вина метаболисано више азотних компоненти.

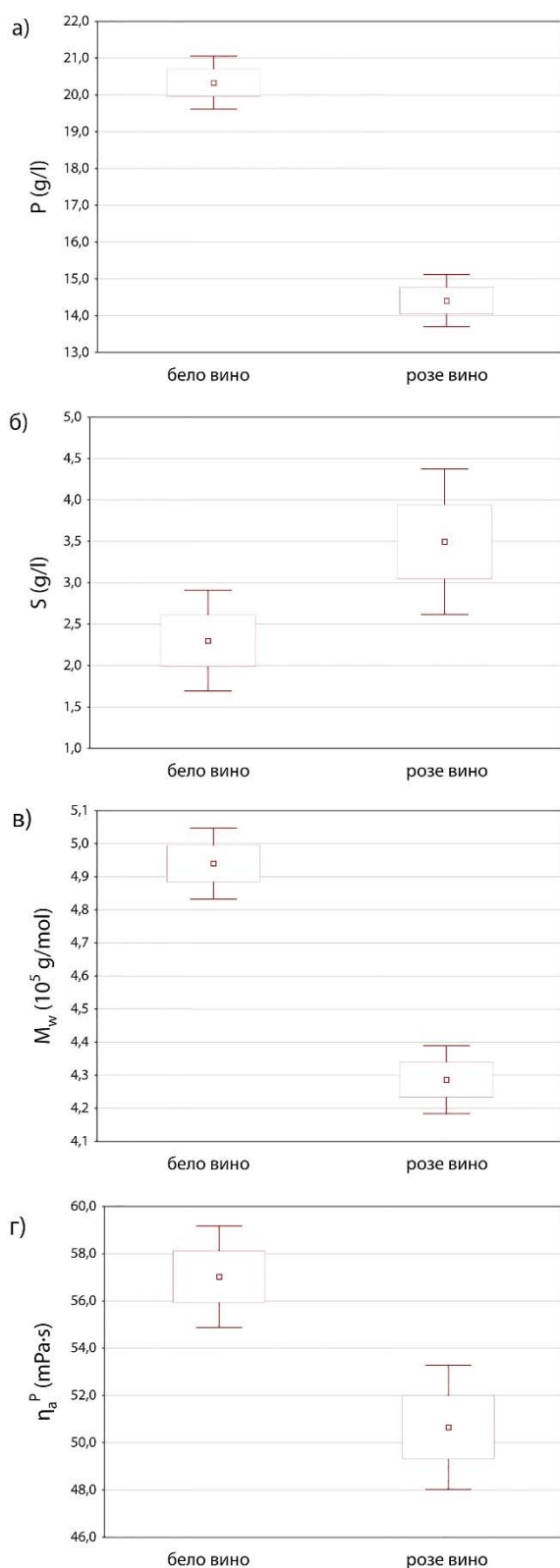
Применом статистичких техника утврђено је да се садржај аминок и амонијачног азота значајно смањивао од почетка биопроцеса. Међутим, у медијуму на бази отпадних токова из производње розе вина (слика 5.10. б) период интензивне потрошње наведених азотних компоненти делимично се поклапа са временом у коме је и смањење количине укупног азота било најзначајније. У овом медијуму значајно смањење концентрације асимилабилног азота забележено до 36 h култивације ( $p < 0,001$ ), док је потрошња свих азотних једињења трајала 12 h дуже. Ово је примећено и током ранијих истраживања због чега је евидентно да се у отпадним водама винарија налазе бројне азотне компоненте које референтни сој у примењеним условима метаболише. Од 36 h до 96 h култивације потрошња асимилабилног азота готово да није ни детектована ( $p = 0,154$ ), а од почетних 73,98 mg/l у култивационој течности је заостало 12,27 mg/l лако усвојивих азотних једињења чиме је остварен степен конверзије од 83,43%. У медијуму чија су основа течни ефлуенти индустрије белог вина (слика 5.10. а) смањење количине аминок и амонијачног азота било је интензивно до 42 h ( $p < 0,001$ ), а затим потпуно безначајно до краја биопроцеса ( $p = 0,425$ ). Почетни и резидуални садржаји асимилабилног азота у поменутом медијуму износили су 83,63 mg/l и 16,80 mg/l, редоследом, што указује да је до краја производног поступка конветовано 79,93% лако усвојивих азотних једињења. Статистичком анализом је доказано да су се култивационе течности добијене по завршетку биопроцеса међусобно значајно разликовале и у погледу количине неискоришћених аминок и амонијачних компоненти ( $p = 0,008$ ), а самим тим и према степену конверзије наведених једињења ( $p = 0,012$ ). Поред тога, на основу добијених резултата може се констатовати да је потрошња одређиваних асимилабилних азотних компоненти у намешаним отпадним водама генерисаним током производње белог и розе вина (66,83 mg/l и 61,72 mg/l, редоследом) била много мања од укупно утрошених азотних једињења (193,67 mg/l и 149,33 mg/l, редоследом) чиме је још једном потврђено да одабрани производни сој из употребљених сировина не усваја само аминок и амонијачни азот. Ово је посебно значајно са еколошког становишта јер се осим производње жељеног биополимера остварује и доста добра разградња материја које доприносе повећању органског и неорганског оптерећења.

Статистичком обрадом графички приказаних резултата (слика 5.10) установљена је изузетно слична динамика промене садржаја укупног азота и фосфора током извођења биосинтезе ксантана у примењеним условима на оба испитивана медијума. Према томе, интензивна потрошња фосфорних једињења примећена је до 42 h култивације ( $p < 0,001$ ), док у наставку биопроцеса промена њиховог садржаја није била значајна што потврђују  $p$ -вредности од 0,117 и 0,237 за отпадне токове из производње белог и розе вина, редоследом. Иако је почетна концентрација фосфорних компоненти у наведеним медијумима (31,43 mg/l и 34,11 mg/l, редоследом) статистички значајно различита, са становишта биотехнолошке производње је занемарљива што потврђује и чињеница да је по завршетку биосинтезе детектована идентична неискоришћена количина анализираних нутријента. Тако је резидуалан фосфор у намешаним ефлуентима индустрије белог и розе вина износио 6,12 mg/l и 6,10 mg/l, чиме су остварени степени конверзије од 80,60% и 82,16%, редоследом, између којих није утврђено постојање статистички значајне разлике ( $p = 0,495$ ).

Како је промена реологије култивационих течности последица успешно изведене производње ксантана (Becker et al., 1998), ток његове биосинтезе испраћен је на основу повећања привидног вискозитета медијума. Помоћу вредности реолошких параметара датих у табели 8.8. (Прилог 1), потврђено је различито реолошко понашање система, као и псеудопластичан карактер медијума, а затим су израчунати привидни вискозитети чија је промена у току култивације приказана на слици 5.10. Иако је статистичком обрадом добијених података доказано да се привидни вискозитет оба медијума значајно повећавао током читавог трајања биопроцеса ( $p < 0,001$ ), графички представљени резултати указују на драстично различите интензитете наведене промене. Утврђено је да се значајна разлика у привидним вискозитетима медијума јавља од самог почетка реолошких мерења ( $p = 0,010$ ). У 36 h култивације привидни вискозитети намешаних отпадних токова из производње белог и розе вина износили су 15,23 mPa·s и 9,76 mPa·s, док су вредности истог параметра у 120 h били 120,66 mPa·s и 58,28 mPa·s, редоследом. И без статистичке анализе очигледно је да су се култивационе течности добијене по завршетку биосинтезе значајно разликовале у погледу привидног вискозитета.

С обзиром да промена вискозитета медијума може бити последица продукције ксантана, али и повећања његове молекулске масе услед умрежавања биосинтетисаних макромолекула и формирања агрегата (García-Ochoa et al., 2000), у свим временима узорковања одређиван је садржај биополимера, након чега је вршена процена његовог квалитета, и то на основу вредности просечне молекулске масе и привидног вискозитета раствора. Добијени резултати приказани су на слици 5.10, а указују да су се вредности свих наведених параметара значајно повећавале од почетка мерења до краја биопроцеса ( $p < 0,001$ ) чиме је утврђен њихов синергистички утицај на пораст вискозитета медијума, који је потврђен и током истраживања других аутора (Li et al., 2009). Ипак, интензивније промене наведених показатеља успешности биосинтезе ксантана уочене су приликом његове производње на намешаним течним ефлуентима које генерише индустрија белог вина што је у складу са израженијим порастом привидног вискозитета овог култивационог медијума. Дакле, у наведеном медијуму садржај ксантана повећавао се од 9,46 g/l до 20,33 g/l при чему је 67,46% шећерних компоненти конвертовано у биополимер. Молекулска маса издвојеног производа имала је вредности од  $3,08 \cdot 10^5$  g/mol до  $4,94 \cdot 10^5$  g/mol, док су вискозитети његових раствора износили од 22,48 mPa·s до 57,02 mPa·s. У медијуму на бази отпадних вода из производње розе вина концентрација биополимера мењала се од 8,23 g/l до 14,41 g/l, а остварени степен конверзије супстрата у жељени производ износио је 49,25%. Ксантан којег је одабрани производни сој продуковао током извођења овог огледа такође је варирао у погледу квалитета што потврђује повећање средње молекулске масе биополимера од  $3,26 \cdot 10^5$  g/mol до  $4,29 \cdot 10^5$  g/mol, али и пораст вискозитета његових раствора од 23,16 mPa·s до 50,65 mPa·s. Анализом добијених резултата може се приметити да се у примењеним условима биосинтетишу макромолекули ксантана чије су молекулске масе у директној корелацији са привидним вискозитетом његових раствора. Ово је уочено и током претходно изведених огледа када је испитиван утицај почетног садржаја шећера у медијумима на бази одабраних отпадних вода винарија на успешност изведеног биотехнолошког процеса. Међутим, количина продукованог ксантана, као и параметри на основу којих је описан његов квалитет имали су значајно мање вредности у овим огледима него када је производни процес изведен у лабораторијском биореактору ( $p < 0,002$ ) што је у складу са резултатима научних радова који су се бавили проучавањем утицаја увећања размера биопроцеса на његову ефикасност (El Enshasy et al., 2011; Nery et al., 2013; Li et al., 2016).

Будући да је циљ ове фазе истраживања коначан одабир култивационог медијума на којем ће се вршити даље унапређење предложеног производног поступка, параметри одабрани за процену успешности биосинтезе ксантана обрађени су применом основних статистичких техника након чега су графички приказани правоугаоним дијаграмима (слика 5.11. а-г). На основу степена расподеле експерименталних података, као и  $p$ -вредности датих у табели 8.9. (Прилог 1) овога пута могу



Слика 5.11. Показатељи успешности биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору на медијумима формулисаног састава:  
 а) садржај ксантана,  
 б) резидуални садржај шећера,  
 в) молекулска маса ксантана,  
 г) вискозитет раствора ксантана

се уочити разлике између испитиваних медијума које се јављају као последица извођења биопроцеса у интензивнијим условима.

Утврђено је да се на медијуму чија су основа отпадни токови из производње белог вина биосинтезише значајно већа количина ксантана ( $p < 0,001$ ) него на намешаним ефлентима које генерише индустрија розе вина (слика 5.11. а). Исто се може приметити и ако се посматра квалитет издвојених производа (слика 5.11. в-г). Дакле, култивацијом референтног соја на отпадним водама скупљеним током припреме шире за производњу белог вина добијају се биополимери значајно већих молекулских маса ( $p < 0,001$ ) због чега њихове растворе карактерише значајнији вискозитет ( $p < 0,001$ ). Много боља продукција ксантана на наведеном медијуму може бити последица присуства мање количине супстанци са инхибиторним деловањем, али и веће потрошње азотних једињења што за резултат има више ћелија производног микроорганизма које су ушле у стационарну фазу раста (Lo et al., 1997). Са друге стране, значајна продукција овог биополимера доводи до смањења вредности рН култивационог медијума, а самим тим и до растварања додатог калцијум-карбоната. Будући да присуство дво-валентних јона калцијума подстиче умрежавање молекула ксантана (Roseiro et al., 1992) јасно је зашто је из поменутог медијума издвојен квалитетнији биополимер. Поред тога, може се приметити да се анализирани култивационе течности нису статистички значајно разликовале једино у погледу садржаја неискоришћених шећерних компоненти (слика 5.11. б) што потврђује  $p$ -вредност од 0,172. Узимајући у обзир све наведено евидентно је да су отпадне воде које настају током производње белог вина намешане тако да садрже 30 g/l редукујућих шећера погоднији супстрати за биосинтезу ксантана. Стога ће се култивациони медијум овако формулисаног састава користити у наставку истраживања за дефинисање оптималних процесних услова за постизање максимално могуће успешности испитиваног биопорцеса.

## 5.5. Моделовање и оптимизација биосинтезе ксантана на отпадним водама винарија

Метаболичка активност бактерија рода *Xanthomonas* на медијуму стандардизованог састава у великој мери зависи од садржаја раствореног кисеоника. Међутим, како услед продукције биополимера долази до драстичног повећања вискозитета култивационе течности дистрибуција кисеоника кроз подлогу је отежана, а његова растворљивост значајно смањена што се негативно одражава на успешност производног поступка. Стога производња ксантана спада међу најзахтевније биопроцесе у погледу регулације процесних параметара одговорних за растворљивост кисеоника (Becker et al., 1998).

Један од начина да се садржај раствореног кисеоника одржава изнад критичног нивоа јесте повећање интензитета аерације чиме се обезбеђује већи запремински проток ваздуха кроз култивациону течност (Kongruang, 2006). Ипак много значајнији утицај на пренос масе кисеоника у веома вискозним системима има брзина мешања. Приликом производње ксантана обично се проток ваздуха одржава на одређеној вредности, из интервала од 0,5 l/l/min до 3,0 l/l/min, док мешање може бити константно или се варира током трајања биопроцеса (Borges et al., 2008; Moshaf et al., 2014). Уколико се биосинтеза изводи при непромењеној брзини мешања продуктивност одабраног производног соја углавном је смањена услед ограниченог преноса масе кисеоника, до којег долази ако је брзина мешања исувише мала, или механичких оштећења ћелија, што је последица веома интензивног мешања. Стога се брзина обртања мешалице најчешће варира у току биопроцеса, и то од око 200 o/min у првим фазама култивације (García-Ochoa et al., 2000), након чега се повећава на вредност која зависи од крајњег циља производног поступка, а углавном се налази у опсегу од 400 o/min до 800 o/min (Peters et al., 1989; Psomas et al., 2007; Mirik et al., 2011).

Осим брзине мешања, конструкциона решења биореактора попут односа пречника импелера и суда, различити облици мешалица, као и њихове комбинације, у великој мери утичу на квалитет хомогенизације медијума, а самим тим и на пренос масе кисеоника (Барас и сар., 2009). У већини биотехнолошких процеса који се изводе у индустријским размерама за мешање се користи стандардна Руштонова турбина са  $d/D_i$  односом од 0,33. Овакав тип мешалице формира радијално струјање течности, а поменути однос традиционално се сматра добрим за дисперговање гаса. Међутим, када је у питању производња ксантана одабир типа мешалице представља велики изазов. Како се њиме бавио велики број истраживача утврђено је да је постављање две стандардне Руштонове турбине на исту осовину и то на тачно одређеном растојању енергетски ефикасније решење за мешање веома вискозних медијума (Nakajima et al., 1990). За још успешније мешање ксантанових култивационих течности препоручује се употреба комбинација мешалица већих пречника тако да однос  $d/D_i$  минимално износи 0,42 (Amanullah et al., 1998b).

Процесни параметар који се, такође, неизоставно прати и одржава у границама оптималним за постизање високе ефикасности биопроцеса је температура. У зависности од одабраног производног соја, састава медијума, као и вредности осталих параметара, температурни оптимум при којем се остварује максимална продукција ксантана веома варира, а налази се у опсегу од 25 до 35°C (Chavan and Vaig, 2016). Осим на принос, процесна температура утиче и на квалитет биополимера (Casas et al., 2000), али и на растворљивост кисеоника (Waites et al., 2001) иако се у том смислу ретко посматра.

Будући да на пренос масе кисеоника, а самим тим и успешност биосинтезе ксантана утиче више параметара, обично је веома тешко утврдити који од њих има пресудни утицај. С обзиром да

класичан приступ експерименталном раду подразумева испитивање утицаја појединачних фактора, поступак одзивне површине је постао најпопуларнија метода за креирање експерименталног плана, моделовање и описивање интеракција великог броја фактора због чега је посебно погодан за решавање оптимизационих проблема (Baş and Boyacı, 2007). Иако је ова статистичка техника често примењивана за унапређење биосинтезе ксантана (Psomas et al., 2007; Salah et al., 2010; de Jesus Assis et al., 2014; Gahrue et al., 2015), у литератури се не срећу наводи који се односе на дефинисање оптималних вредности процесних параметара значајних за растворљивост кисеоника.

Узимајући у обзир наведене чињенице, у наставку истраживања изведено је математичко моделовање, а затим и оптимизација производње ксантана у лабораторијском биореактору, метаболичком активношћу референтног соја, на адекватно намешаним отпадним водама из производње белог вина, у погледу вредности температуре, интензитета аерације и брзине мешања. Како би се остварио жељени циљ испитан је ток биосинтезе ксантана при различитим процесним условима варираним у складу са одабраним експерименталним планом, након чега су применом поступка одзивне површине дефинисани математички модели који описују утицај испитиваних параметара на одабране одзиве. Оптимизација процесних параметара одговорних за растворљивост кисеоника изведена је помоћу методе жељене функције у комбинацији са полиномским зависностима посматраних одзива. Валидност добијених резултата проверена је извођењем биосинтезе ксантана при оптималним процесним условима.

Прецизно дефинисање услова производње на лабораторијском нивоу представља основу за пројектовање биотехнолошких процеса великих размера. Поступак подразумева оптимизацију селектованих параметара у биореакторима мањих запремина (до 10 l), а затим извођење биопроцеса под оптималним условима у пилот постројењима (запремине од 50 до 300 l). Успешност превођења биопроцеса са лабораторијског на индустријски ниво је загарантована уколико се у свим фазама користе биореактори уједначених конструкционих карактеристика (García-Ochoa and Gomez, 2009). Стога је оптимизација производње ксантана на отпадним водама винарија у погледу вредности одабраних процесних параметара извршена на основу резултата експеримената изведених у лабораторијском биореактору (укупне запремине 7 l) препоручених геометријских односа за постизање високе ефикасности производног поступка у индустријским размерама (део 4.4).

### 5.5.1. Извођење статистички дизајнираних експеримената

Избор одговарајућег експерименталног плана је кључан корак у примени поступка одзивне површине. Када се испитује утицај три фактора на посматрани процес најчешће се примењује Бокс-Бенкенов дизајн јер је у поређењу са другим експерименталним плановима много ефикаснији (Ferreira et al., 2007). Због тога је Бокс-Бенкенов план са три фактора на три нивоа и три понављања у централној тачки коришћен и у оквиру ових истраживања. Овако дизајнирани експерименти подразумевали су извођење 15 независних култивација при тачно дефинисаним процесним условима (табела 4.1) у трајању од 96 h. Имајући у виду да је, у односу на претходно изведене огледе, коришћен биореактор са већим односом  $d/D_i$  у који су постављена четири одбојника обезбеђена је много боља хомогенизација медијума, као и интензивнија аерација услед чега је одговарајућа корекција процесних параметара, вршена након 24 h (део 4.4). У складу са одабраним експерименталним планом и техничким могућностима биореактора, а на основу доступних летературних података, у наставку биопроцеса температура је одржавана на 25°C, 30°C или 35°C (Psomas et al., 2007) при интензитету аерације од 1,00 l/l/min, 1,75 l/l/min или 2,50 l/l/min (Borges et al., 2008) и брзини мешања од 200 o/min, 500 o/min или 800 o/min (Gilani et al., 2011).

Непосредно након промене вредности планом предвиђених процесних параметара уочено је формирање густе пене на површини култивационих течности у свим огледима осим у оним под редним бројевима 5, 6, 9 и 10. Заједничко за ове експерименте јесте непромењена брзина мешања (200 o/min) што јасно указује да интензивно мешање има за последицу пенушање медијума због чега је додавање антипенушавца неизбежно. Са друге стране, у свим огледима је у каснијим фазама култивације вршена корекција вредности рН како би се поменути параметар одржао у оптималним границама (6,0-8,0) за постизање максималне продукције биополимера (Mirik et al., 2011).

Ток биосинтезе ксантана при различитим процесним условима испитан је анализом узорака култивационих течности у погледу садржаја биомасе, раствореног кисеоника, шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора. Од момента промене услова одређивана је и реологија медијума, садржај биосинтетисаног ксантана, али и његова молекулска маса. Промена вредности наведених параметара током култивације одабраног производног соја у примењеним експерименталним условима приказана је на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2). На основу графички представљених резултата јасно се могу сагледати специфичности сваког изведеног огледа. По завршетку биопроцеса, поред наведених параметара, одређен је и вискозитет раствора издвојеног биополимера. Све ове вредности приказане су у табели 5.19, а коришћене су за дефинисање математичких модела.

Анализом кривих раста одабраног производног микроорганизма датих на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2) може се приметити да је садржај ћелија у култивационој течности на почетку биопроцеса износио од  $10 \cdot 10^8$  cfu/ml до  $13 \cdot 10^8$  cfu/ml што јасно указује да су коришћени инокулуми уједначеног квалитета, те да је њихова припрема одлично стандардизована. Поред тога, резултати приказани на поменутих сликама показују да изостаје лаг фаза, односно фаза прилагођавања микроорганизма на новонастале услове средине чиме је још једном утврђено да су инокулуми веома добро припремљени. Непосредно након инокулације уочено је умножавање ћелија које је било најинтензивније у прва 24 h култивације. С обзиром да је у овом моменту концентрација биомасе износила од  $105 \cdot 10^8$  cfu/ml до  $117 \cdot 10^8$  cfu/ml евидентно је да је биопроцес вођен у идентичним условима, као и то да су се ћелије донете инокулумом налазиле у приближно једнаком физиолошком стадијуму. Након наведеног временског периода коригована је вредност одређених процесних параметара, а умножавање ћелија, иако значајно спорије, забележено је до 36 h, односно 42 h култивације. Нешто дужа експоненцијална фаза уочена је у огледима у којима није промењена температура што је у складу са литературним подацима да извођење биопроцеса на 25°C више погодује умножавању биомасе него биосинтези ксантана (Psomas et al., 2007; Mirugesan et al., 2012). У наставку култивације наступила је стационарна фаза раста јер се број ћелија производног соја одржавао константним до краја производног поступка. Међутим, приликом испитивања тока биосинтезе ксантана при брзини мешања од 200 o/min (огледи 5, 6, 9 и 10) запажено је да крива раста има опадајући тренд од око 60 h. Ово се може објаснити чињеницом да је умножавање биомасе успорено уколико се биопроцес изводи при константној брзини мешања која је мања од 500 o/min због ограниченог преноса масе кисеоника, а самим тим и отежане растворљивости поменутог гасовитог нутријента у медијумима повећаног вискозитета (García-Ochoa et al., 2000). Због тога се садржај ћелија референтног соја у култивационим течностима добијеним по завршетку биопроцеса налазио у интервалу од  $75 \cdot 10^8$  cfu/ml до  $140 \cdot 10^8$  cfu/ml.

Резултати приказани на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2) указују да се почетни садржај раствореног кисеоника кретао од 89,20% до 96,97%. У току прва 24 h култивације дошло је до значајног смањења садржаја кисеоника што се поклапа са периодом интензивног раста и размножавања производног микроорганизма. Такође, важно је приметити да је динамика опадања концентрације овог нутријента у наведеном периоду изузетно слична у свим изведеним огледима, а измерене вредности непосредно пре промене услова налазиле су се у интервалу од 30,40% до

37,45%. У складу са планом извођења експеримената (табела 4.1) након 24 h извршена је одговарајућа корекција вредности процесних параметара услед које се садржај раствореног кисеоника повећао на вредност од 44,26% до 99,79%. Значајно је напоменути да у огледу под редним бројем 9 нису повећани ни интензитет аерације ни брзина мешања због чега само у овом случају није забележен пораст садржаја посматраног нутријента. Након промене услова уочено је опадање садржаја раствореног кисеоника при чему је овај тренд значајно другачије изражен међу огледима, а последица је неједнаке метаболичке активности производног соја (Kongruang, 2006; Zhang and Chen, 2010), али и различитог вискозитета медијума (Borges et al., 2008). По завршеној биосинтези концентрација раствореног кисеоника у добијеним култивационим течностима износила је од 1,23% до 90,11%. Смањење садржаја анализираних нутријента испод критичне вредности за успешно одвијање овог биопроцеса (Додић и Граховац, 2013) примећено је само у огледима под редним бројевима 5, 6, 9 и 10 чија је заједничка карактеристика непромењена брзина мешања (200 o/min). Како је током извођења ових експеримената садржај раствореног кисеоника већ од око 52 h испод критичних 10% јасно је зашто је неколико часова касније примећено и смањење броја ћелија производне културе.

На основу графички представљених резултата (слике 8.1-8.15; Прилог 2) може се запазити да се иницијални садржај редукујућих шећера у коришћеним медијумима налазио у интервалу од 29,32 g/l до 32,05 g/l. Ови приближно исти подаци указују да током складиштења сировина и стерилизације није дошло до значајне деградације шећерних компоненти што је нарочито важно код извођења више огледа на истом медијуму. Услед примењених услова садржај шећера се у свим огледима смањивао током читавог трајања биопроцеса, али веома различитим интензитетом. На основу кривих раста може се констатовати да се у првих 36 h, односно 42 h поменути нутријент у највећој мери трошио за умножавање биомасе, док је у наставку култивације, када су се ћелије производног соја налазиле у стационарној фази раста, шећер који је утрошен углавном искоришћен за биосинтезу ксантана. Само у огледима у којима је током читавог трајања биопроцеса брзина мешања износила 200 o/min (огледи 5, 6, 9 и 10) није забележена значајнија промена садржаја шећерних компоненти у последњих 24 h. По завршетку биопроцеса резидуални садржаји шећера у добијеним култивационим течностима износили су од 2,59 g/l до 15,81 g/l због чега су остварене веома високе вредности степена конверзије извора угљеника, и то од 47,57% до 89,80%. Међутим, садржај шећера који је заостао након извођења појединих експеримената са становишта биотехнолошке производње није занемарљив (13,42 g/l за оглед 1, 13,98 g/l за оглед 9, 10,68 g/l за оглед 10 и 15,81 g/l за оглед 11). Анализом услова под којима су наведени огледи вођени није могуће уочити јединствену повезаност међу њима.

Према резултатима датим на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2) почетни садржај укупног азота кретао се у опсегу од 343,00 mg/l до 392,00 mg/l што су веома блиске вредности. Иако је у свим огледима коришћен исти медијум уочена минимална одступања последица су складиштења и стерилизације намешаних сировина. Промена садржаја укупног азота током биосинтезе ксантана при испитиваним процесним условима у потпуности се поклопила са фазама раста примењеног производног соја. Дакле, потрошња поменутог нутријента била је интензивна од самог почетка биопроцеса јер су га ћелије производног микроорганизма користиле за раст и размножавање. Међутим, након 36h, односно 42 h култивације није дошло до значајне промене садржаја укупног азота јер је производни сој ушао у стационарну фазу раста. Концентрација укупних азотних компоненти која је заостала по завршетку биопроцеса износила је од 84,00 mg/l до 140,00 mg/l чиме су остварене вредности степена конверзије овог нутријента од 60,00% до 76,79%.

Табела 5.19. Показатељи успешности биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при различитим процесним условима

Редни број огледа	Y <sub>1</sub> X (10 <sup>8</sup> cfu/ml)	Y <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Y <sub>3</sub> S (g/l)	Y <sub>4</sub> N <sub>ук</sub> (mg/l)	Y <sub>5</sub> N <sub>ас</sub> (mg/l)	Y <sub>6</sub> P <sub>ук</sub> (mg/l)	Y <sub>7</sub> η <sub>а</sub> (mPa-s)	Y <sub>8</sub> P (g/l)	Y <sub>9</sub> M <sub>w</sub> (10 <sup>5</sup> g/mol)	Y <sub>10</sub> η <sub>ар</sub> (mPa-s)
1	131	80,75	13,42	126,00	4,20	5,14	74,64	13,33	4,55	39,79
2	129	25,61	7,55	91,00	3,40	5,45	103,79	15,33	4,55	37,58
3	140	59,40	6,37	140,00	2,80	4,17	139,29	17,26	6,48	47,81
4	137	22,10	2,59	118,00	3,40	4,03	152,30	17,78	5,36	51,39
5	104	1,43	6,07	122,00	5,60	5,51	102,36	14,51	5,94	62,72
6	93	2,00	8,09	91,00	7,80	4,54	55,15	11,63	5,17	41,16
7	148	84,59	6,88	119,00	7,00	3,90	135,36	14,61	7,13	50,59
8	135	73,51	5,22	119,00	8,40	5,24	149,59	17,66	6,03	54,25
9	75	1,23	13,98	84,00	7,00	5,58	45,12	8,92	5,48	47,00
10	99	1,48	10,68	140,00	10,60	6,49	85,65	16,15	5,80	54,31
11	134	90,11	15,81	112,00	9,20	6,66	50,72	10,05	3,60	38,81
12	137	71,30	3,73	98,00	5,60	3,23	127,78	19,79	5,96	50,60
13	138	12,05	3,20	140,00	4,80	5,51	231,89	23,64	7,65	59,72
14	140	11,50	3,08	133,00	5,60	4,50	240,09	24,18	7,64	60,77
15	135	10,95	3,23	129,00	4,20	5,85	244,60	24,07	7,63	58,16



Садржај аминок и амонијачног азота који је одређен у медијумима непосредно по инокулацији износио је од 72,80 mg/l до 89,60 mg/l. Имајући у виду састав коришћених сировина (табела 5.2) ови подаци су очекивани, а указују да од укупне количине азота у примењеној подлози ћелије имају на располагању око 20% лако усвојивих извора азота. Међутим, значајно веће вредности степена конверзије укупног азота потврђују да у отпадним водама винарија постоје и неке друге азотне компоненте које примењени производни сој може да усваја. Анализом графички представљених експерименталних резултата (слике 8.1-8.15; Прилог 2) може се уочити да се у свим огледима период интензивне потрошње наведених лако усвојивих азотних једињења делимично поклопио са временом у коме је и смањење количине укупног азота било најзначајније. Знатно смањење садржаја асимилабилног азота забележено до 36 h култивације, док је потрошња свих азотних компоненти у појединим огледима (огледи 5, 6, 9 и 10) трајала 12 h дуже. Ово је примећено и током ранијих истраживања, а последица је присуства бројних асимилабилних азотних једињења која нису у аминок или амонијачном облику. Од 36 h култивације потрошња асимилабилног азота готово да није ни детектована, а по завршетку биопроцеса одређен је у концентрацији од 2,80 mg/l до 10,60 mg/l.

Почетни садржај укупних фосфорних компоненти у коришћеним медијумима кретао се од 30,19 mg/l до 38,52 mg/l што је у складу са очекивањима. У свим огледима уочена је идентична динамика промене садржаја укупног азота и фосфора. Према томе, интензивна потрошња фосфорних једињења забележена је до 36 h, односно 42 h култивације, док у наставку биосинтезе промена њиховог садржаја није била приметна. Неискоришћена количина фосфора у култивационим течностима добијеним по завршетку биопроцеса (од 3,23 mg/l до 6,66 mg/l), као и веома високе вредности степена конверзије овог нутријента (од 80,04% до 90,98%) указују да се биотехнолошком производњом ксантана, без обзира на примењене процесне услове, може остварити значајно уклањање фосфорних компоненти из отпадних вода винарија.

Будући да је промена реологије култивационе течности резултат успешно изведене производње ксантана (Becker et al., 1998), ток биосинтезе испраћен је и на основу повећања вискозитета медијума. На основу вредности реолошких параметара потврђено је различито реолошко понашање система, као и псеудопластичан карактер медијума који је био различито изражен међу медијумима из различитих огледа, али и у оквиру истог огледа са повећањем времена трајања биопроцеса. Помоћу наведених вредности индекса тока и фактора конзистенције израчунати су привидни вискозитети медијума чија је промена у току култивације представљена на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2). Резултати приказани на поменутих сликама указују да су се након 24 h добиле култивационе течности веома сличних реолошких карактеристика. Дакле, на почетку мерења вредности привидног вискозитета медијума износиле су од 12,40 mPa·s до 14,98 mPa·s што је и очекивано јер се у поменутом временском периоду биопроцес изводио под идентичним условима. У наставку култивације дошло је до повећања привидног вискозитета култивационог медијума при чему овај тренд није био подједнако изражен у свим огледима, а последица је извођења биосинтезе ксантана при различитим процесним условима (Kongruang, 2006; Gilani et al., 2011). Значајно је напоменути да је једино у огледу у којем није коригован интензитет аерације, али ни брзина мешања (оглед 9) забележена најмања промена посматраног параметра која је након 60 h култивације готово неприметна. Ово се може приписати недовољној количини расположивог кисеоника (Додић и Граховац, 2013). По завршетку биопроцеса вискозитети добијених култивационих течности налазили су се у интервалу од 45,12 mPa·s до 244,60 mPa·s. С обзиром да вискозитет медијума зависи од више фактора (Reis et al., 2010), наведени резултати не пружају тачне информације о томе при којим условима се биосинтетише највећа количина ксантана жељеног квалитета. Стога је потребно издвојити биополимер из култивационе течности и одредити његов квалитет како би дефинисале вредности процесних параметара при којима се остварује највећа могућа успешност испитиваног производног поступка.

Пошто је ксантан секундарни метаболит његов садржај у култивационим течностима одређиван је од 24 h, односно од момента промене услова јер у почетним фазама биопроцеса не настају значајније количине овог метаболита (Savvides et al., 2012). Након наведеног временског периода медијуми су садржали од 2,92 g/l до 3,58 g/l ксантана. Овако мале разлике су још једна потврда да се испитивани производни поступак до тренутка корекције вредности процесних параметара изводио под идентичним условима. Резултати приказани на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2) указују да се количина биосинтетисаног ксантана повећавала током трајања биопроцеса при чему је овај тренд различито изражен. Већ у 36 h култивације може се уочити значајна разлика међу медијумима у погледу концентрације синтетисаног биополимера. Такође, у појединим експериментима у последњим фазама култивације није детектована важнија промена садржаја жељеног производа (оглед 5, 6, 9 и 10). Под претпоставком да је у овим огледима услед недовољног садржаја раствореног кисеоника метаболичка активност производне културе инхибирана добијени резултати су у складу са очекивањима. По завршетку биопроцеса садржај ксантана у култивационим течностима кретао се од 8,92 g/l до 24,18 g/l при чему су остварене вредности степена конверзије супстрата у производ износиле од 29,47% до 80,10%.

Промена квалитета ксантана током култивације испраћена је на основу вредности средње молекулске масе биополимера издвојених из узорак култивационих течности узетих у дефинисаним временским интервалима. На основу резултата приказаних на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2) може се приметити повећање молекулске масе биополимера које је последица умрежавања макромолекула и формирања агрегата (García-Ochoa et al., 2000). Ксантан биосинтетисан у првих 24 h култивације имао је молекулску масу од  $2,42 \cdot 10^5$  g/mol до  $2,93 \cdot 10^5$  g/mol која се до краја производног поступка повећала на вредност од  $3,60 \cdot 10^5$  g/mol до  $7,65 \cdot 10^5$  g/mol. У зависности од испитиваних услова поменути тренд био је мање или више изражен што је потврђено и током ранијих истраживања (Zeng-sheng et al., 2009). Само у огледу број 9, који карактерише непромењена брзина мешања, али и интензитет аерације, у последњих 30 h култивације није уочена промена молекулске масе ксантана, али ни његовог садржаја, а самим тим ни вискозитета медијума. Поред тога, значајно је истаћи да у осталим експериментима у којима није повећана брзина мешања (оглед 6, 9 и 10) долази до повећања посматраног показатеља квалитета ксантана. С обзиром да је у последњим фазама биосинтезе изведене у условима дефинисаним наведеним огледима није уочена промена концентрације жељеног производа, повећање вискозитета медијума у том периоду може се приписати формирању надмолекулских структура.

Квалитет ксантана које референтни сој продукује при различитим процесним условима процењен је и на основу привидног вискозитета његових раствора. Добијени резултати приказани су у табели 5.19, а указују да су се у испитиваним условима синтетисали биополимери различитих реолошких карактеристика јер су се израчунати привидни вискозитети налазили у интервалу од 37,58 mPa·s до 62,72 mPa·s. Имајући у виду литературне податке да на састав макромолекула, од којег зависи вискозитет раствора биополимера, утиче температура (Casas et al., 2000), али и интензитет аерације и брзина мешања (Borges et al., 2008) добијени резултати су у складу са очекивањима. Такође, ако се упореде вредности оба показатеља квалитета може се приметити да молекулска маса ксантана и привидни вискозитет његових раствора нису директно повезани уколико се биосинтеза ксантана изводи при различитим процесним условима што је у складу са резултатима других аутора (Paragianni et al., 2001). Међутим, ово се разликује од резултата добијених у претходним фазама истраживања где су доказани литературни подаци да од концентрације супстрата у великој мери зависи квалитет синтетисаног биополимера, али су његова молекулска маса и вискозитет раствора увек у директној корелацији (Brandão et al., 2013) што упућује на констатацију да варирање састава медијума утиче на дужину ланаца макромолекула са истим односно ацетатних и пируватних група.

## 5.5.2. Дефинисање математичких модела

Основни циљ моделовања је дефинисање математичких једначина на основу којих се при одговарајућем степену тачности може описати жељени процес или систем. Развој адекватних математичких модела је неопходан корак који претходи оптимизацији, симулацији, али и управљају процесима и системима (Хоџић и Хоџић, 2014). Како би се дефинисале зависности које описују утицај варираних процесних параметара на одабране показатеље успешности биосинтезе ксантана експериментални подаци (табела 5.19) фитовани су полиномом другог реда јер овако добијени модели укључују и чланове који описују интеракцију између различитих фактора. Успешност фитовања процењена је на основу вредности коефицијената детерминације.

На основу предзнака коефицијената у развијеним регресионим једначинама може се установити утицај сваког од фактора, али и њихових међусобних интеракција на посматране одзиве. Дакле, уколико линеарни и квадратни коефицијенти имају позитиван знак веза између одговарајућих променљивих је директна, док негативан знак указује на инверзну везу (Илић и Мијаиловић, 2014). Са друге стране, позитиван знак коефицијената интеракције упућује на синергистички утицај одређених фактора, али ако је негативан евидентан је њихов антагонистички ефекат на анализирани одзив.

За процену статистичке значајности сваког од коефицијената регресионе једначине коришћена је  $p$ -вредност. Регресиони коефицијенти су значајни, у интервалу поверења од 95%, уколико је њихова  $p$ -вредност мања од 0,05. Интензитет утицаја статистички значајних коефицијената одређен је поређењем апсолутних  $t$ -вредности.

Ипак, за боље разумевање интеракција варираних фактора на параметре биосинтезе ксантана добијене регресионе једначине представљене су и графички, тродимензионалним одзивним површинама. Свака од њих приказује моделом предвиђен утицај два фактора на посматрани одзив при константној вредности трећег. Са одзивних површина могуће је проценити оптималне опсеге испитиваних процесних параметара за које се остварује жељена вредност одабраног одзива.

### 5.5.2.1. Провера адекватности математичких модела

Испитивање адекватности и значајности математичког модела одређује се на основу резултата анализе варијансе која већ дужи низ година представља основну статистичку технику за обраду експерименталних података (Илић и Мијаиловић, 2014). Резултати анализе варијансе моделованих одзива за биосинтезу ксантана на намешаним отпадним водама из производње белог вина приказани су у табели 5.20.

Адекватност добијених регресионих једначина потврђена је помоћу Фишевог (Fisher) теста. С обзиром да су све  $F$ -вредности приказане у табели 5.20. мање од табличних вредности за одговарајући степен слободе примењеног експерименталног плана, дефинисани квадратни модели сматрају се погодним за описивање утицаја варираних фактора на посматране одзиве. Поред тога, модели полинома другог реда свих моделованих одзива су статистички значајни у интервалу поверења од 95% што потврђују изузетно ниске  $p$ -вредности приказане у истој табели.

Табела 5.20. Анализа варијансе моделованих одзива за биосинтезу ксантана на медијуму формулисаног састава

Одзив	Порекло							
	Резидуал		Модел			F-вредност	p-вредност	
	SS	DF	MS	SS	DF			MS
Y <sub>1</sub>	85,400	5	17,080	24069,600	10	2406,960	1408,973	< 0,000001
Y <sub>2</sub>	846,680	5	169,337	36517,080	10	3651,708	21,565	0,001699
Y <sub>3</sub>	15,125	5	3,0249	1049,517	10	104,952	34,696	0,000542
Y <sub>4</sub>	336,800	5	67,350	211565,200	10	21156,520	314,128	0,000002
Y <sub>5</sub>	5,9167	5	1,183	603,843	10	60,384	51,029	0,000212
Y <sub>6</sub>	1,1998	5	0,240	395,073	10	39,507	164,646	0,000012
Y <sub>7</sub>	1585,400	5	317,080	311091,200	10	31109,120	98,111	0,000042
Y <sub>8</sub>	15,095	5	3,019	4438,745	10	443,875	147,025	0,000016
Y <sub>9</sub>	1,84	5	3,67·10 <sup>-1</sup>	5,47·10 <sup>2</sup>	10	5,47·10	148,864	0,000015
Y <sub>10</sub>	71,450	5	14,289	38848,210	10	3884,821	271,866	0,000003

### 5.5.2.2. Математички модел за садржај биомасе

Фитовањем експерименталних података који се односе на садржај биомасе по завршетку култивације (табела 5.19) полиномом другог реда добијена је регресиона једначина која описује утицај варираних процесних параметара на поменути одзив. Регресиони коефицијенти, њихова значајност и коефицијент детерминације приказани су у табели 5.21.

Број ћелија референтног производног соја који је одређен по завршетку биосинтезе ксантана фитује се са коефицијентом детерминације од 0,987 (табела 5.21) на основу којег се може констатовати да је остварена веома јака веза између експерименталних и рачунских вредности независно променљивих и одабране зависно променљиве. Добијеном регресионом једначином није могло бити објашњено само 1,3% варијација у вредностима броја бактеријских ћелија што је последица утицаја других мање значајних фактора који овим експериментима нису обухваћени.

Резултати дати у табели 5.21. указују да највећи утицај на садржај биомасе у култивационој течности имају линеарни и квадратни члан брзине мешања, док доста мањи утицај на овај одзив имају линеарни и квадратни члан интензитета аерације. Ово је у складу са истраживањима других аутора који су доказали да су оба процесна параметра у великој мери одговорна за пренос масе кисеоника, који је неопходан за раст и размножавање ћелија производног соја, одржавање метаболичке активности, али и за биосинтезу ксантана (de Jesus Assis et al., 2014). Међутим, много већи утицај брзине мешања на посматрани одзив може се објаснити чињеницом да управо овај процесни параметар у значајнијој мери потпомаже растварање кисеоника у изузетно вискозним системима какви су ксантанове култивационе течности (Borges et al., 2008). Додатна предност мешања огледа се и у могућности уклањања слузавог полисахаридног слоја са површине ћелија чиме се смањују локална дифузиона ограничена (Moshaf et al., 2014). Ефекти линеарног и квадратног члана температуре, као и свих коефицијената интеракције нису статистички значајни у интервалу поверења од 95%. У циљу бољег разумевања утицаја варираних процесних параметара на садржај биомасе нацртане су одзивне површине које су приказане на слици 5.12. (а-в).

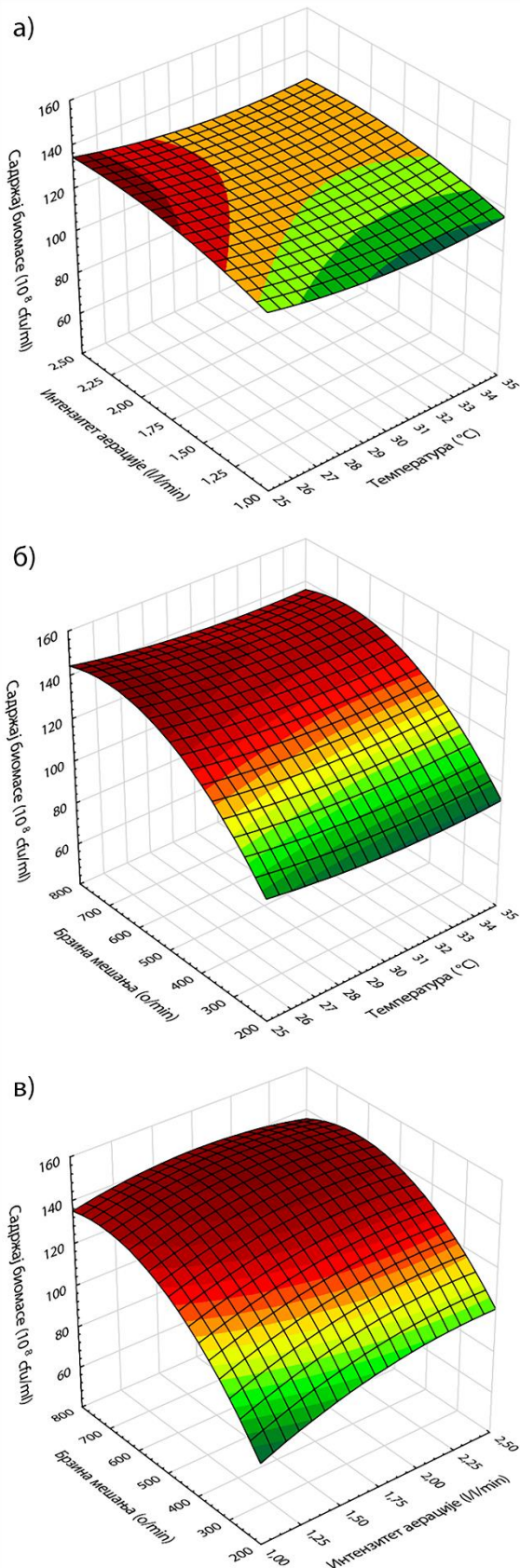
Табела 5.21. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај биомасе

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
b <sub>0</sub>	85,939723	0,987905	0,368564
<b>линеарни</b>			
b <sub>1</sub>	-6,841630	-1,289732	0,253574
b <sub>2</sub>	58,851800*	2,693651	0,043110
b <sub>3</sub>	0,353009*	6,974771	0,000932
<b>квадратни</b>			
b <sub>11</sub>	0,106666	1,239742	0,270081
b <sub>22</sub>	-10,814816*	-2,828162	0,036754
b <sub>33</sub>	-0,000226*	-9,453035	0,000224
<b>интеракције</b>			
b <sub>12</sub>	-0,066665	-0,120974	0,908427
b <sub>13</sub>	-0,000333	-0,241953	0,818433
b <sub>23</sub>	-0,023333	-2,540406	0,051868
R <sup>2</sup>		0,987	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

Слика 5.12. (а) илуструје моделом предвиђен утицај температуре и интензитета аерације на садржај биомасе при константној вредности брзине мешања (500 о/мин). Анализом приказаних резултата може се уочити пораст вредности посматраног одзива са интензивирањем протока ваздуха што је у складу са доступним литературним подацима да повећање брзине аерације два до три пута значајно утиче на раст и размножавање ћелија, али и одржавање њихове метаболичке активности у веома вискозним култивационим течностима (Kongruang, 2006). Међутим, у примењеним експерименталним условима, поменута зависност је израженија уколико се биосинтеза изводи при температури од 25°C до 28°C. С обзиром да је праћењем тока култивације утврђено да до одумирања ћелија производног соја у целокупном испитиваном опсегу температурних вредности долази у медијумима са недовољном количином доступног кисеоника (слике 8.1-8.15) ово се може објаснити чињеницом да се на нижим температурама раствара већа количина кисеоника него при вишим (Waites et al., 2001). Са друге стране, ако се интензитет аерације одржава на вредности од 1,00 l/l/min до 1,75 l/l/min повећање процесне температуре не утиче значајно на садржај биомасе у култивационој течности, док се при протоку ваздуха изнад 1,75 l/l/min вредност посматраног одзива смањује са порастом температуре при којој се биосинтеза одвија. Према предвиђањима модела максималан број ћелија производне културе од око  $127 \cdot 10^8$  cfu/ml постиже се при минималној температури (од 25°C до 26°C) и максималном протоку ваздуха (од 1,75 l/l/min до 2,50 l/l/min). На овај антагонистички ефекат анализираних фактора на вредност посматраног одзива указује и негативна вредност коефицијента интеракције b<sub>12</sub> (табела 5.21).

На слици 5.12 (б) приказан је моделом предвиђен утицај температуре и брзине мешања медијума на садржај биомасе при константном интензитету аерације (1,75 l/l/min). На основу представљених резултата јасно се запажа да је посматрани одзив прилично уједначен у целокупном испитиваном опсегу температуре, док промена брзине мешања у значајној мери утиче на број ћелија производног соја. Уочава се да се са повећањем броја обртања мешалице до 600 о/мин по-



Слика 5.12. Садржај биомасе у функцији два фактора при константној вредности трећег:  
 а) брзина мешања (500 o/min),  
 б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),  
 в) температура (30°C)

већава и садржај биомасе у култивационој течности. Разлог томе лежи у чињеници да ако је брзина мешања адекватна долази до растварања довољне количине кисеоника за одржавање метаболичке активности производне културе (Gilani et al., 2011). Значајно је напоменути да при брзинама мешања већим од 600 o/min вредност посматраног одзива није промењена што указује да интензивно мешање не изазива механичка оштећења ћелија производног микроорганизама. Максималан садржај биомасе у култивационој течности по завршетку биопроцеса од око  $145 \cdot 10^8$  cfu/ml уочава се при температури од 25°C до 27°C и брзини мешања од 600 o/min до 800 o/min. До готово идентичних резултата током својих истраживања дошли су и други аутори (Psomas et al., 2007).

Слика 5.12 (в) приказује предикцију садржаја биомасе у култивационој течности по завршетку биопроцеса изведеног при константној температури (30°C) и варираним вредностима интензитета аерације и брзине мешања. Може се уочити да посматрани одзив има веома високе вредности у широком опсегу варираних фактора. Поред тога, приказана одзивна површина потврђује резултате дате у табели 5.21, односно доказује да мешање има много већи утицај на одржавање метаболичке активности одабране производне културе јер се у целокупном испитиваном опсегу интензитета аерације вредност посматраног одзива повећава са порастом брзине обртања мешалице до око 500 o/min док са даљим интензивирањем мешања не долази до значајне промене броја бактеријских ћелија у култивационој течности. Слична запажања уочена су и анализом резултата приказаних одзивном површином на слици 5.12. (б), а потврђују литературне податке да варирање брзине мешања од 500 o/min до 1000 o/min не изазива механичка оштећења ћелија производног соја (Paragianni et al., 2001). Промена протока ваздуха у мањој мери утиче на садржај биомасе ако се брзина обртања мешалице након 24 h култивације одржава у опсегу од 200 o/min до 400 o/min што је у складу са раније публикованим резултатима

(Borges et al., 2008). Дакле, при слабијој брзини мешања број одумрлих ћелија услед недостатка раствореног кисеоника се смањује са порастом интензитета аерације. Ипак, максималан садржај биомасе од око  $145 \cdot 10^8$  cfu/ml моделом је предвиђен у опсегу интензитета аерације од 1,50 l/l/min до 2,50 l/l/min и брзине мешања од око 500 o/min до 800 o/min.

### 5.5.2.3. Математички модел за садржај раствореног кисеоника

Применом полинома другог реда за фитовање експериментално измерених вредности садржаја раствореног кисеоника у култивационим течностима по завршетку биопроцеса (табела 5.19) дефинисан је квадратни модел који описује утицај испитиваних процесних параметара на поменути одзив. Коефицијенти добијене регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације дати су у табели 5.22.

Табела 5.22. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај раствореног кисеоника

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
$b_0$	807,756522*	2,949252	0,031913
<b>линеарни</b>			
$b_1$	-45,464842*	-2,722227	0,041664
$b_2$	-144,669870	-2,103152	0,089395
$b_3$	0,098394	0,617477	0,563953
<b>квадратни</b>			
$b_{11}$	0,696342*	2,570610	0,049998
$b_{22}$	32,097733*	2,666062	0,044558
$b_{33}$	0,000127	1,694226	0,150997
<b>интеракције</b>			
$b_{12}$	1,189334	0,685471	0,523528
$b_{13}$	-0,001941	-0,447583	0,673179
$b_{23}$	-0,021178	-0,732348	0,496827
<b>R<sup>2</sup></b>		0,951	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

Фитовање експерименталних података квадратном једначином је адекватно будући да коефицијент детерминације износи 0,951 (табела 5.22) што значи да је веома велики проценат варијација у вредностима садржаја раствореног кисеоника објашњен заједничким утицајем испитиваних параметара. Дакле, само 4,9% варијација се не може објаснити дефинисаним моделом, а представља ефекте оних фактора који нису укључени у моделовање.

На основу резултата датих у табели 5.22. може се приметити да линеарни и квадратни члан температуре, као и квадратни члан интензитета аерације статистички значајно утичу на вредност посматраног одзива при чему је јачина њиховог утицаја подједнако изражена. Негативан предзак линеарног коефицијента температуре указује да се садржај раствореног кисеоника повећава са смањењем вредности поменутог процесног параметра што је у складу са доступним подацима

(Waites et al., 2001; Atiya, 2012). Утицај интензитета аерације на посматрани одзив је јасан јер, како наводе расположиви литературни извори, са повећањем протока ваздуха директно се повећава и садржај раствореног кисеоника (Kongruang, 2006). Ефекти линеарног члана интензитета аерације, линеарног и квадратног члана брзине мешања, као и свих коефицијената интеракције нису се показали као статистички значајни у интервалу поверења од 95%. Како би била очигледнија зависност садржаја раствореног кисеоника од варираних процесних параметара нацртане су одзивне површине, а представљене су на слици 5.13. (а-в).

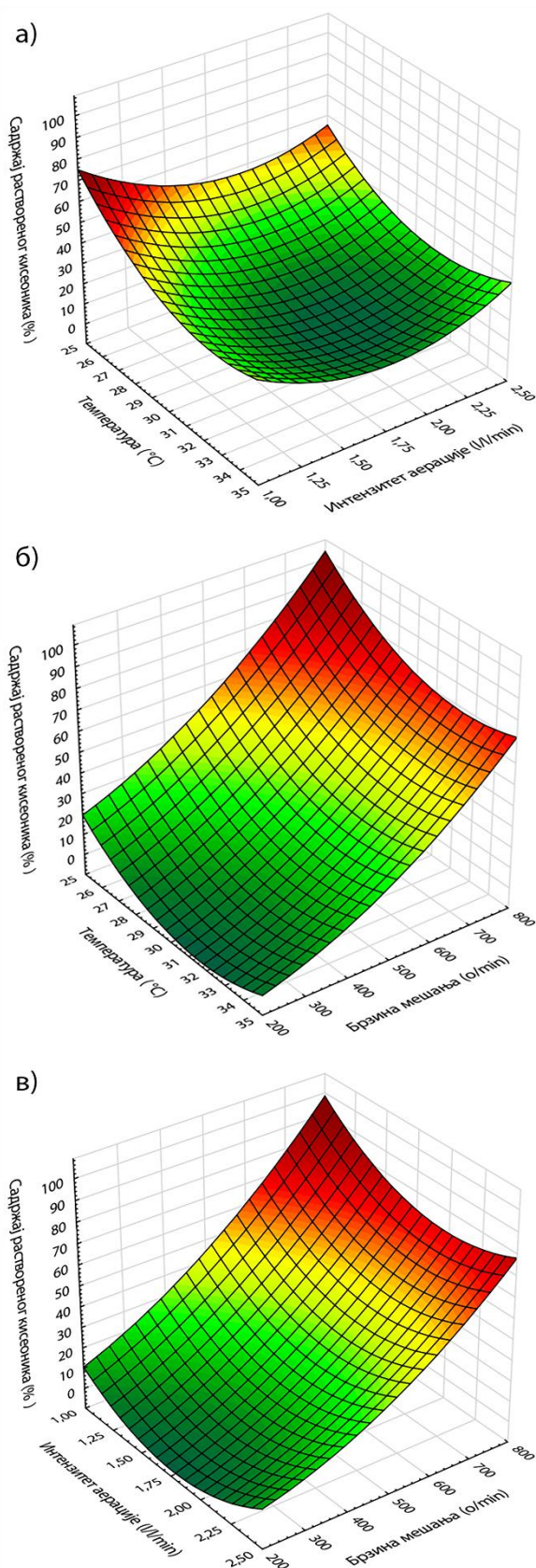
Слика 5.13. (а) приказује моделом предвиђен утицај температуре и интензитета аерације на садржај раствореног кисеоника при константној брзини мешања од 500 о/min. Анализом графички представљених резултата уочавају се веома ниске вредности посматраног одзива у широком опсегу варираних параметара. Да не би дошло до инхибиције метаболичке активности одабраног производног соја и престанка биосинтезе ксантана најчешће се садржај раствореног кисеоника у продукционој фази одржава у опсегу од 10% до 30% (Casas et al., 2000; Nery et al., 2013). Према предвиђањима модела поменути гасовити нутријент ће се растворити у концентрацији чак и већој од 30% ако се температура процеса одржава у опсегу од 25°C до 28°C без обзира на проток ваздуха. Ипак, максимална вредност посматраног одзива од око 70% остварује се при минималној температури (од 25°C до 26°C), али и при минималном интензитету аерације (од 1,00 l/l/min до 1,25 l/l/min). На синергистички утицај наведених процесних параметара на растворљивост кисеоника указује и позитивна вредност коефицијента интеракције  $b_{12}$  (табела 5.22).

На слици 5.13. (б) илустрован је моделом предвиђен утицај температуре и брзине мешања медијума на садржај раствореног кисеоника ако се у продукционој фази интензитет аерације одржава на константној вредности од 1,75 l/l/min. Са приказане одзивне површине запажа се да варирање температуре у задатом опсегу не утиче значајно на вредност посматраног одзива ако је брзина обртања мешалице константна и налази се у интервалу од 200 о/min до 600 о/min. Међутим, при већој брзини мешања уочава се благо повећање концентрације раствореног кисеоника са смањењем вредности процесне температуре. Ипак, до значајног пораста садржаја раствореног кисеоника долази са интензивирањем брзине мешања независно од температуре на којој се биопроцес одвија. Иако је извођењем биопроцеса при брзини мешања већој од 400 о/min обезбеђена довољна количина кисеоника за успешно одвијање биопроцеса (већа од 30%), максимална вредност посматраног одзива (од 95% до 100%) моделом је предвиђена при минималној температури (од 25°C до 27°C) и максималној брзини мешања (од 700 о/min до 800 о/min). На антагонистички ефекат посматраних фактора указује и негативна вредност коефицијента интеракције  $b_{13}$  (табела 5.22).

Слика 5.13. (в) илуструје моделом предвиђен утицај интензитета аерације и брзине мешања култивационе течности на концентрацију раствореног кисеоника ако је процесна температура константна (30°C). Анализом приказане одзивне површине запажа се да уколико је интензитет хомогенизације медијума константан протоа ваздуха утиче на вредност посматраног одзива на исти начин као и температура. Са друге стране, ако се производни поступак изводи при непромењеном интензитету аерације, запажа се да је утицај брзине мешања на растворљивост кисеоника потпуно идентичан као и у претходном случају (слика 5.13. б). Узимајући у обзир све наведено, као и чињеницу да је мешање параметар који у значајној мери утиче на пренос масе кисеоника у веома вискозним медијумима (Borges et al., 2008), очигледно је зашто се растварање поменутог гасовитог нутријента у концентрацији већој од 95% постиже управо при интензитету аерације од 1,00 l/l/min до 1,25 l/l/min и брзини мешања од 700 о/min до 800 о/min.

Сумирајући све графички представљене резултате (слика 5.13. а-в) намеће се констатација да је брзина мешања процесни параметар који у примењеним условима највише утиче на растварање





Слика 5.13. Садржај раствореног кисеоника у функцији два фактора при константној вредности трећег:  
 а) брзина мешања (500 о/min),  
 б) интензитет аерације (1,75 l/min),  
 в) температура (30°C)

кисеоника. Међутим, подаци наведени у табели 5.22. указују да утицај мешања на посматрани одзив није статистички значајан. Ово се може објаснити тиме да су вредности садржаја кисеоника које су коришћене за дефинисање математичког модела измерене у култивационим течностима драстично различитих вискозитета (табела 5.19). С обзиром да је и вискозитет медијума један од фактора који у великој мери утиче на дистрибуцију кисеоника, а самим тим и његову растворљивост (Becker et al., 1998) треба га искључити из математичког модела јер то није параметар чији се ефекат испитује. Стога је на основу резултата приказаних на сликама 8.1-8.15. (Прилог 2) прикупљена нова серија података која је представљала вредности садржаја раствореног кисеоника у култивационим течностима чији је привидни вискозитет 35 mPa·s. Очитане вредности фитоване су полиномом другог реда како би се дефинисао математички модел који јасно описује утицај температуре, интензитета аерације и брзине мешања медијума на ефикасност растварања кисеоника. Резултати статистичке обраде података приказани су у табели 5.23.

Веома висока вредност коефицијента детерминације од 0,993 (табела 5.23) указује да полином другог реда изузетно апроксимира експерименталне податке за садржај раствореног кисеоника у једнако вискозним култивационим течностима будући да само 0,7% варијација није обухваћено моделом. Резултати дати у истој табели указују да највећи утицај на растворљивост кисеоника имају линеарни и квадратни члан брзине мешања медијума што је у складу са доступним литературним подацима (Atiya, 2012; Waites et al., 2001). Мањи, али такође статистички значајан утицај показују и линеарни и квадратни члан процесне температуре при чему је још једном потврђено инверзно деловање овог параметра на вредност посматраног одзива (Waites et al., 2001; Okafor, 2007).

Поред тога, бројни литературни извори наводе да је растворљивост кисеоника уско повезана са брзином мешања, али и са интензитетом аерације (de Jesus Assis et al., 2014; Moshaf et al., 2014) што је доказано и током ових истраживања јер је утврђена статистичка значајност коефицијента интеракције наведених процесних параметара. Ефекти осталих чланова у добијеној регресиониј једначини нису се показали као статистички значајни у интервалу поверења од 95%. Одзивне површине које представљају графички приказ објашњеног модела дате су у Прилогу 2 на слици 8.16. (а-в).

Табела 5.23. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај раствореног кисеоника у култивационој течности вискозитета 35 mPa·s

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
b <sub>0</sub>	339,378657*	3,576800	0,015929
<b>линеарни</b>			
b <sub>1</sub>	-26,758663*	-4,624786	0,005711
b <sub>2</sub>	21,782255	0,914058	0,402613
b <sub>3</sub>	0,393737*	7,132453	0,000841
<b>квадратни</b>			
b <sub>11</sub>	0,437827*	4,665463	0,005505
b <sub>22</sub>	2,335207	0,559886	0,599711
b <sub>33</sub>	-0,000248*	-9,518703	0,000216
<b>интеракције</b>			
b <sub>12</sub>	-0,604684	-1,005988	0,360594
b <sub>13</sub>	0,000919	0,611266	0,567744
b <sub>23</sub>	-0,026067*	-2,601964	0,048135
R <sup>2</sup>		0,993	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

#### 5.5.2.4. Математички модел за садржај шећера

Резултати одређивања садржаја шећера заосталог у култивационим течностима по завршетку биосинтезе ксантана при различитим процесним условима (табела 5.19) фитовани су полиномом другог реда. Као исход тога добијена је регресиона једначина која описује утицај испитиваних параметара на количину шећерних компоненти која током извођења производног поступка неће бити метаболирана. Регресиони коефицијенти, њихова значајност и коефицијент детерминације дати су у табели 5.24.

За фитовање вредности резидуалног садржаја шећера остварен је веома висок коефицијент детерминације који износи 0,942 (табела 5.24.), а указује да је дефинисани математички модел адекватан јер њиме није могуће објаснити само 5,8% од укупних варијација у вредностима посматраног одзива. Посматрајући остале резултате приказане у истој табели уочава се да на количину неискоришћених шећерних компоненти у значајној и, може се рећи, подједнакој мери утичу линеарни и квадратни члан интензитета аерације, као и квадратни члан брзине мешања култивационог медијума. С обзиром да метаболичка активност бактерија рода *Xanthomonas*, а самим тим и брзина усвајања извора угљеника у великој мери зависе од садржаја доступног

кисеоника није необично зашто су се параметри директно одговорни за његову растворљивост показали као најзначајнији. До истих запажања дошли су и други аутори (Paragianni et al., 2001; Psomas et al., 2007; Zeng-sheng et al., 2009). Ефекти линеарног и квадратног члана температуре, линеарног члана брзине мешања, као и свих чланова који описују интеракцију варираних фактора нису статистички значајни у интервалу поверења од 95%. Одзивне површине које приказују моделом предвиђен утицај два параметра на посматрани одзив при константној вредности трећег фактора су у Прилогу 2 на слици 8.17. (а-в).

Табела 5.24. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај шећера

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
$b_0$	39,774655	1,086550	0,326819
<b>линеарни</b>			
$b_1$	0,032964	0,014767	0,988789
$b_2$	-31,221624*	-3,396007	0,019335
$b_3$	-0,006229	-0,292461	0,781682
<b>квадратни</b>			
$b_{11}$	-0,003376	-0,093242	0,929333
$b_{22}$	7,817553*	4,858323	0,004640
$b_{33}$	0,000039*	3,846582	0,012043
<b>интеракције</b>			
$b_{12}$	0,139199	0,600264	0,574498
$b_{13}$	-0,000612	-1,055934	0,339325
$b_{23}$	-0,009762	-2,525837	0,052797
$R^2$		0,942	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

#### 5.5.2.5. Математички модел за садржај укупног и асимилабилног азота

Фитовањем података који се односе на резидуалне садржаје укупног и асимилабилног азота (табела 5.19) полиномом другог реда дефинисани су квадратни математички модели који описују утицај варираних процесних параметара на вредност наведених одзива. Резултати статистичке анализе, односно коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијенти детерминације приказани су у табели 5.25.

Коефицијенти детерминације добијени фитовањем садржаја укупног и асимилабилног азота износе 0,932 и 0,921 (табела 5.25), редоследом, а упућују на подједнако добро поклапање експерименталних и моделом предвиђених резултата. Наведене вредности указују да свега 6,8%, односно 7,9% укупних варијација у вредностим посматраних одзива, редоследом, није могло бити објашњено дефинисаним математичким зависностима. Анализом резултата приказаних у истој табели може се запазити да највећи утицај на резидуални садржај укупног азота има коефицијент интеракције интензитета аерације и брзине мешања, док нешто мањи утицај на овај одзив има квадратни члан брзине мешања. Поменути чланови имају статистички значајан утицај и у моделу који описује зависност варираних процесних параметара на неискоришћени садржај аминокиселина и

амонијачних азотних компоненти при чему је ефекат квадратног члана брзине мешања много више изражен. Без обзира на уочене разлике у интензитетима утицаја статистички значајних регресионих коефицијената, добијени резултати потврђују литературне податке да количина посматраног нутријента која ће бити метаболисана током извођења производног поступка директно зависи од концентрације раствореног кисеоника (Casas et al., 2000). Ефекти осталих коефицијената у добијеним регресионим једначинама нису статистички значајни у интервалу поверења од 95%. Како би се јасније разумео утицај варираних процесних параметара на резидуални садржај укупног, али и асимилабилног азота нацртане су одзивне површине које су у Прилогу 2 представљене на сликама 8.18. (а-в) и 8.19. (а-в).

Табела 5.25. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијенти детерминације за садржај укупног и асимилабилног азота

Коефицијенти	Укупан азот			Асимилабилан азот		
	Вредност	t-вредност	p-вредност	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>						
b <sub>0</sub>	-66,388688	-0,384353	0,716520	-34,615752	-1,511914	0,190959
<b>линеарни</b>						
b <sub>1</sub>	6,899991	0,655092	0,541345	2,768334	1,982846	0,104198
b <sub>2</sub>	87,388832	2,014445	0,100077	2,574080	0,447648	0,673135
b <sub>3</sub>	0,160694	1,599046	0,170705	-0,021130	-1,586234	0,173545
<b>квадратни</b>						
b <sub>11</sub>	-0,220000	-1,287779	0,254202	-0,046333	-2,046111	0,096118
b <sub>22</sub>	-17,333334	-2,282889	0,071280	-0,459260	-0,456328	0,667292
b <sub>33</sub>	-0,000175*	-3,687744	0,014179	0,000039*	6,167769	0,001631
<b>интеракције</b>						
b <sub>12</sub>	0,866669	0,792037	0,464241	0,093333	0,643493	0,548252
b <sub>13</sub>	0,005167	1,888701	0,117556	-0,000133	-0,367711	0,728141
b <sub>23</sub>	-0,077778*	-4,264806	0,007978	-0,008000*	-3,309398	0,021254
R <sup>2</sup>		0,932			0,921	

\* Статистички значајан утицај (p<0,05)

#### 5.5.2.6. Математички модел за садржај укупног фосфора

Како би се дефинисао математички модел који описује утицај варираних процесних параметара на резидуални садржај укупног фосфора вредности овог показатеља успешности биосинтезе ксантана (табела 5.19) фитоване су полиномом другог реда. Коефицијенти добијене регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације приказани су у табели 5.26.

За фитовање експериментално одређене количине укупног фосфора која је по завршетку биопроцеса заостала у култивационим течностима коефицијент детерминације износи 0,909 (табела 5.26), а указује да 9,1% варијација није могло бити објашњено добијеним квадратним моделом. Такође, утврђено је да од свих чланова полинома другог реда којим су фитовани резултати лабораторијских испитивања статистички значајан утицај има једино коефицијент интеракције интензитета аерације и брзине мешања. С обзиром да је предзнак овог члана регресионе једначине негативан евидентан је антагонистички ефекат наведених фактора на

посматрани одзив. Имајући у виду резултате моделовања резидуалног садржаја азота, такође веома важног лимитирајућег нутријента за умножавање биомасе, добијени подаци су у складу са очекивањима. Дефинисан математички модел приказан је и графички тродимензионалним одзивним површинама које су дате у Прилогу 2 на слици 8.20. (а-в).

Табела 5.26. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај укупног фосфора

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
b <sub>0</sub>	-15,350937	-1,488942	0,196676
<b>линеарни</b>			
b <sub>1</sub>	1,407660	2,239019	0,075307
b <sub>2</sub>	2,162002	0,834950	0,441802
b <sub>3</sub>	-0,006123	-1,020824	0,354163
<b>квадратни</b>			
b <sub>11</sub>	-0,025608	-2,511333	0,053740
b <sub>22</sub>	0,086964	0,191887	0,855380
b <sub>33</sub>	0,000002	0,587480	0,582408
<b>интеракције</b>			
b <sub>12</sub>	-0,029190	-0,446922	0,673625
b <sub>13</sub>	0,000387	2,368406	0,064079
b <sub>23</sub>	-0,004817*	-4,425411	0,006857
R <sup>2</sup>		0,909	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

#### 5.5.2.7. Математички модел за вискозитет култивационог медијума

Вредности привидног вискозитета култивационих течности добијених извођењем биосинтезе ксантана при различитим вредностима варираних процесних параметара (табела 5.19) фитоване су полиномом другог реда. Као резултат тога добијена је регресиона једначина која описује утицај испитиваних фактора на наведени одзив. Регресиони коефицијенти, њихова значајност и коефицијент детерминације дати су у табели 5.27.

Фитовање резултата реолошких одређивања жељеном функционалном зависношћу је адекватно јер коефицијент детерминације износи 0,975 (табела 5.27) што значи да само 2,5% варијација не може бити објашњено дефинисаним моделом. Анализирајући параметре дате у наведеној табели може се запазити да највећи ефекат на посматрани одзив имају квадратни чланови интензитета аерације и брзине мешања. Мањи, али такође статистички значајан утицај на вискозитет култивационог медијума имају линеарни чланови наведених процесних параметара, као и линеарни и квадратни члан температуре. С обзиром да се вискозитет култивационе течности користи за поуздано праћење биосинтезе ксантана на лабораторијском и индустријском нивоу (Salamone, 1996), велики број аутора утврдио је да управо овај индикатор успешности поменутог биопроцеса у великој мери зависи од температуре, интензитета аерације, али и брзине мешања (Kongruang, 2006; Borges et al., 2009; Gilani et al., 2011). Међутим, важно је истаћи да наведени процесни параметри индиректно утичу на посматрани одзив јер се варирањем њихових

вредности мења квантитет жељеног биополимера, али и његов квалитет што се одражава на привидни вискозитет медијума (Додић и Граховац, 2013). За интервал поверења од 95% ефекти свих коефицијената интеракције испитиваних фактора нису се показали као статистички значајни. Одзивне површине које приказују моделом предвиђену зависност анализираног одзива од два фактора при константној вредности трећег дате су у Прилогу 2 на слици 8.21. (а-в).

Табела 5.27. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за привидни вискозитет култивационог медијума

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
b <sub>0</sub>	-1979,088963	-5,280656	0,003243
<b>линеарни</b>			
b <sub>1</sub>	102,656159*	4,491844	0,006448
b <sub>2</sub>	531,585747*	5,647511	0,002416
b <sub>3</sub>	0,630493*	2,891509	0,034127
<b>квадратни</b>			
b <sub>11</sub>	-1,761065*	-4,750945	0,005100
b <sub>22</sub>	-137,471942*	-8,344510	0,000404
b <sub>33</sub>	-0,000936*	-9,087821	0,000270
<b>интеракције</b>			
b <sub>12</sub>	-1,075681	-0,453064	0,669486
b <sub>13</sub>	0,010240	1,725187	0,145089
b <sub>23</sub>	0,040589	1,025744	0,352052
R <sup>2</sup>		0,975	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

#### 5.5.2.8. Математички модел за садржај ксантана

Фитовањем експерименталних података који се односе на садржај ксантана у култивационим течностима по завршетку биопроцеса (табела 5.19) полиномом другог реда добијена је регресиона једначина која описује утицај варираних процесних параметара на поменути одзив. Резултати статистичке анализе, односно регресиони коефицијенти, њихова значајност и коефицијент детерминације приказани су у табели 5.28.

Будући да коефицијент детерминације износи 0,953 (табела 5.28) може се констатовати да је остварена веома јака веза између експерименталних и моделом предвиђених вредности садржаја биосинтетисаног ксантана. Дефинисаним математичким моделом није могло бити објашњено само 4,7% варијација у вредностима посматраног одзива што је последица утицаја неких мање значајних фактора који током ових истраживања нису разматрани.

Анализирајући резултате статистичке анализе приказане у табели 5.28. може се уочити да највећи утицај на садржај ксантана имају квадратни чланови интензитета аерације и брзине мешања, док доста мањи утицај на поменути одзив имају линеарни и квадратни члан температуре, као и линеарни члан интензитета аерације. Ово се може објаснити чињеницом да су проток ваздуха и брзина обртања мешалице у значајној мери одговорни за пренос масе кисеоника који је

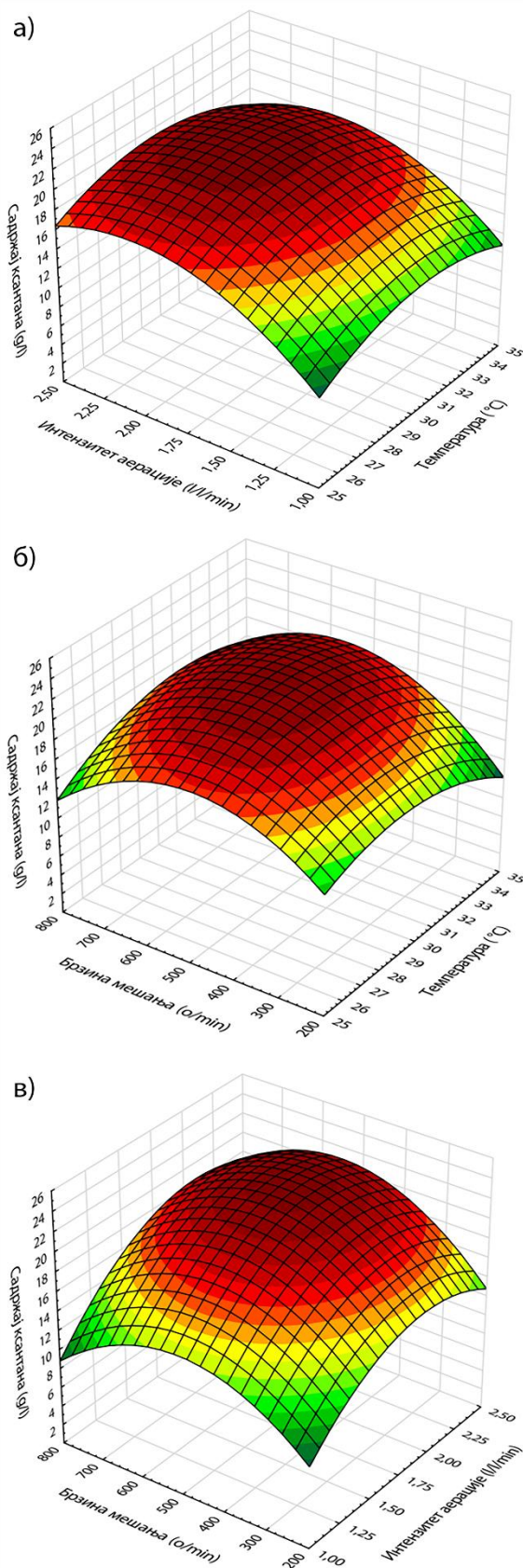
бактеријама рода *Xanthomonas* неопходан како за умножавање биомасе тако и за биосинтезу ксантана што је доказано и током других истраживања (Mirik et al., 2011; de Jesus Assis et al., 2014; Ghashghaei et al., 2016). Иако је утицај температуре на вредност посматраног одзива мање интензиван, значај овог процесног параметра свакако да није занемарљив. Осим што делује на растварање кисеоника (Atiya, 2012), процесна температура има много већи ефекат на усмеравање метаболичке активности производног соја, било да је то продукција што веће количине биополимера (Chavan and Baig, 2016) или пак биосинтеза макромолекула одређене хемијске структуре, а самим тим и квалитета (Casas et al., 2000). Линеарни члан брзине мешања, као и сви коефицијенти интеракције у интервалу поверења од 95% нису показали статистички значајан утицај на вредност посматраног одзива. Како би се боље разумела зависност посматраног одзива од варираних фактора нацртане одзивне површине приказане су на слици 5.14. (а-в).

Табела 5.28. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за садржај ксантана

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
b <sub>0</sub>	-144,314075	-3,946216	0,010892
<b>линеарни</b>			
b <sub>1</sub>	8,342749*	3,741095	0,013416
b <sub>2</sub>	33,182568*	3,612797	0,015335
b <sub>3</sub>	0,034212	1,607931	0,168762
<b>квадратни</b>			
b <sub>11</sub>	-0,143283*	-3,961416	0,010728
b <sub>22</sub>	-7,922222*	-4,928149	0,004367
b <sub>33</sub>	-0,000064*	-6,390700	0,001390
<b>интеракције</b>			
b <sub>12</sub>	-0,098666	-0,425886	0,687901
b <sub>13</sub>	0,000988	1,706437	0,148638
b <sub>23</sub>	0,002793	0,723246	0,501935
R <sup>2</sup>		0,953	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

Слика 5.14. (а) илуструје моделом предвиђен утицај температуре и интензитета аерације на успешност производње ксантана при брзини мешања од 500 o/min. Са приказане одзивне површине запажа се да варирање температуре у задатом опсегу не утиче у великој мери на вредност посматраног одзива ако је проток ваздуха константан. Само при интензитету аерације већем од 1,75 l/l/min повећање процесне температуре до око 32°C позитивно утиче на продуктивност одабране производне културе. Међутим, до интензивнијег повећања садржаја ксантана у култивационом медијуму долази са интензивирањем протока ваздуха до 1,75 l/l/min без обзира на температуру на којој се биопроцес одвија док са даљим порастом интензитета аерације не долази до битније промене вредности посматраног одзива у читавом испитиваном температурном опсегу. Ипак, према предвиђањима модела концентрација ксантана већа од 20 g/l постиже се култивацијом референтног производног соја на температури од 28°C до 32°C и при протоку ваздуха од 1,75 l/l/min до 2,25 l/l/min. Наведени опсежи температуре и интензитета аерације препоручени су и од стране других аутора као најпогоднији за остваривање високог приноса



Слика 5.14. Садржај ксантана у функцији два фактора при константној вредности трећег:

- а) брзина мешања (500 o/min),
- б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),
- в) температура (30°C)

жељеног биополимера (Borges et al., 2008; Murugesan et al., 2012; Gomashе et al., 2013).

На слици 5.14. (б) приказан је моделом предвиђен утицај процесне температуре и брзине мешања медијума на садржај ксантана биосинтетисаног при константном интензитету аерације од 1,75 l/l/min. Анализом графички представљених резултата уочава се да, при константном обртању мешалице, промена температуре у читавом испитиваном опсегу не утиче значајно на вредност посматраног одзива. Међутим, ако се производни процес одвија при брзини мешања медијума у опсегу од 400 o/min до 600 o/min пораст температуре до 32°C позитивно утиче на синтезу биополимера. Са друге стране, ако се температура одржава константном на било којој вредности из анализираниог интервала до повећања садржаја ксантана у култивационом медијуму долази са порастом брзине мешања до око 600 o/min док при интензивнијем мешању вредност посматраног одзива опада. И у овом случају култивационе течности садржале би више од 20 g/l ксантана ако би се биосинтеза одвијала на температури од 28°C до 32°C и при брзини мешања од 400 o/min до 600 o/min. Према подацима из доступне научне и стручне литературе поменути интервал брзине мешања сматра се оптималним за успешно извођење производње ксантана у лабораторијским биореакторима (Psomas et al., 2007; Mirik et al., 2011; de Jesus Assis et al., 2014).

Слика 5.14. (в) приказује предикцију садржаја ксантана у култивационој течности по завршетку извођења биопроцеса на константној температури (30°C) и при варираним вредностима интензитета аерације и брзине мешања. На основу представљених резултата јасно се запажа да са повећањем протока ваздуха долази до повећања концентрације биополимера у медијуму независно од интензитета његове хомогенизације. Са друге стране, ако се аерација одржава на минималном нивоу уочавају се веома ниске вредности посматраног одзива без обзира на примењену брзину обртања мешалице. Међутим, при већем протоку ваздуха интензивирање хомогенизације медијума у значајнијој мери утиче на по-



већање количине биосинтетисаног ксантана. Синергистички ефекат ова два процесна параметра, на који указује и позитиван коефицијент интеракције  $b_{23}$  дат у табели 5.28, огледа се у побољшању преноса масе кисеоника из гасне у течну фазу при интензивнијим условима аерације и мешања (Casas et al., 2000; Kongruang, 2006). У медијумима са довољним садржајем раствореног кисеоника метаболичка активност производног соја није инхибирана, а резултира продукцијом велике количине ксантана. Садржај жељеног биополимера у култивационој течности већи од 20 g/l предвиђен је у опсегу интензитета аерације од 1,75 l/l/min до 2,25 l/l/min и брзине мешања од 400 o/min до 600 o/min.

#### 5.5.2.9. Математички модел за молекулску масу ксантана

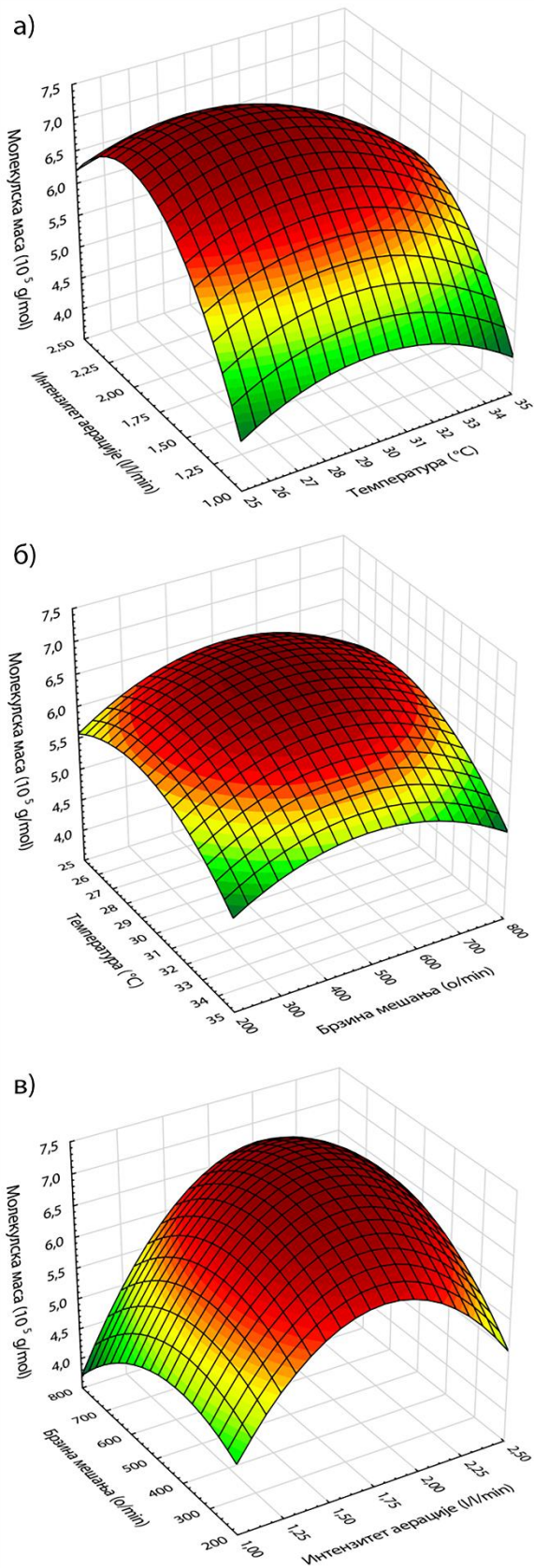
Како би се дефинисала математичка зависност која описује утицај температуре, интензитета аерације и брзине мешања на биосинтезу ксантана одређених молекулских маса вредности овог показатеља квалитета биополимера (табела 5.19) фитоване су квадратном једначином. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације приказани су у табели 5.29.

Табела 5.29. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за молекулску масу ксантана

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
$b_0$	-33,479702	-2,624450	0,046846
<b>линеарни</b>			
$b_1$	1,940093	2,494000	0,054892
$b_2$	12,160171*	3,795401	0,012688
$b_3$	0,006715	0,904680	0,407111
<b>квадратни</b>			
$b_{11}$	-0,030953	-2,453228	0,057707
$b_{22}$	-2,901626*	-5,174433	0,003542
$b_{33}$	-0,000009	-2,527381	0,052698
<b>интеракције</b>			
$b_{12}$	-0,074334	-0,919815	0,399871
$b_{13}$	-0,000056	-0,274870	0,794412
$b_{23}$	0,002255	1,674572	0,154871
$R^2$		0,912	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

За фитовање експериментално одређених вредности молекулске масе ксантана коефицијент детерминације износи 0,912 (табела 5.29), а указује да је велики проценат варијација у вредностима посматраног одзива могуће образложити заједничким утицајем испитиваних процесних параметара. Од укупних варијација свега 8,8% њих се не може објаснити добијеним моделом јер представља ефекте оних фактора који нису укључени у моделовање.



Слика 5.15. Молекулска маса ксантана у функцији два фактора при константној вредности трећег:

- а) брзина мешања (500 o/min),
- б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),
- в) температура ( $30^{\circ}$ C)

Посматрајући резултате представљене у табели 5.29. може се приметити да само линеарни и квадратни члан интензитета аерације значајно утичу на вредност анализiranог показатеља квалитета ксантана што се може објаснити чињеницом да се са повећањем степена засићења подлоге кисеоником молекулска маса продукованог биополимера проширује ка већим вредностима. Ефекти линеарног и квадратног члана температуре, линеарног и квадратног члана брзине мешања, као и свих коефицијената интеракције нису показали статистички значајан утицај на вредност посматраног одзива у интервалу поверења од 95%. Одзивне површине које представљају графички приказ дефинисаног математичког модела дате су на слици 5.15. (а-в).

На слици 5.15. (а) дат је моделом предвиђен утицај температуре и интензитета аерације на молекулску масу ксантана које одабрани производни сој биосинтетише при константној брзини мешања (500 o/min). Анализом приказаних резултата запажа се да варирање температуре у задатом опсегу не утиче значајно на вредност посматраног одзива ако се проток ваздуха одржава константним у опсегу од 1,00 до 2,00 l/l/min. Међутим, при интензивнијој аерацији са повећањем процесне температуре долази до производње ксантана мањих молекулских маса што је у складу са доступним литературним подацима (Casas et al., 2000). Са друге стране, ако се биосинтеза ксантана изводи при непромењеној температури уочава се позитиван утицај повећања протока ваздуха на вредност посматраног одзива. Дакле, како би се из култивационе течности по завршетку биопроцеса издвојио ксантан што већих молекулских маса (од  $6,0 \cdot 10^5$  g/mol до  $7,0 \cdot 10^5$  g/mol) према предвиђањима модела потребно је у продукционој фази одржавати температуру у интервалу од  $25^{\circ}$ C до  $30^{\circ}$ C, а интензитет аерације од 1,75 l/l/min до 2,50 l/l/min.

Слика 5.15. (б) илуструје моделом предвиђен утицај температуре и брзине мешања меди-јума на биосинтезу ксантана одређених молекулских маса при константном интензитету аерације (1,75 l/l/min). Са приказане одзивне површине уочава се смањење вредности посматраног одзива са повећањем процесне температуре изнад 30°C без обзира на интензитет хомогенизације култивационе течности. Међутим, ако би се током извођења предложеног производног поступка температура оджавала константном на било којој вредности из испитиваног опсега промена брзине обртања мешалице не би утицала значајно на квалитет биосинтетисаног ксантана што су током својих истраживања доказали и други аутори (Psomas et al., 2007; Zeng-sheng et al., 2009). Ипак, биополимер молекулске масе веће од  $6,5 \cdot 10^5$  g/mol према предвиђањима модела продукује се на температури од 27°C до 30°C и при брзини мешања од 400 o/min до 600 o/min.

На слици 5.15. (в) приказан је моделом предвиђен утицај интензитета аерације и брзине мешања медијума на молекулску масу биополимера синтетисаних на температури од 30°C. Графички представљени резултати јасно указују да се вредност посматраног одзива значајно повећава са повећањем протока ваздуха до 2,00 l/l/min, док се са даљим интензивирањем аерације, без обзира на брзину обртања мешалице, запажа негативан ефекат варираног фактора на анализирани одзив. Међутим, промена брзине мешања ни приликом извођења биопроцеса у условима константне аерације не утиче значајно на молекулску масу продукованог ксантана. Биосинтеза ксантана максималних молекулских маса (од  $6,0 \cdot 10^5$  g/mol до  $7,0 \cdot 10^5$  g/mol) моделом је предвиђена у опсегу интензитета аерације од 1,75 l/l/min до 2,25 l/l/min без обзира на брзину мешања култивационог медијума.

#### 5.5.2.10. Математички модел за вискозитет раствора ксантана

Резултати одређивања привидног вискозитета раствора ксантана биосинтетисаних при различитим вредностима варираних процесних параметара (табела 5.19) фитовани су полиномом другог реда како би се дефинисао математички модел који описује утицај испитиваних фактора на посматрани одзив. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације дати су у табели 5.30.

Будући да добијена вредност коефицијента детерминације износи 0,925 (табела 5.30) може се констатовати да је фитовање експерименталних података жељеном функционалном зависношћу адекватно те да дефинисана регресиона једначина може да објасни велики број варијација у вредностима привидног вискозитета раствора ксантана. Остатак од свега 7,5% моделом необјашњених варијација у ствари је последица утицаја других мање значајних фактора чији ефекат током ових истраживања није испитиван.

На основу резултата приказаних у табели 5.30. може се увидети да на вредност посматраног одзива највише утичу квадратни члан интензитета аерације, као и члан који описује интеракцију температуре и брзине мешања, док је у нешто мањој мери изражен утицај линеарног члана интензитета аерације и квадратног члана температуре. Познато је да вискозитет раствора ксантана тачно дефинисаних концентрација не зависи само од молекулске масе биополимера већ и од састава макромолекула, али и распореда пируватних и ацетатних група (Reis et al., 2010). Стога је јасно зашто поред интензитета аерације који је одговоран за биосинтезу ксантана великих молекулских маса (табела 5.29) статистички значајан утицај показују и други фактори. Међу њима потребно је посебно истаћи утицај температуре јер се при различитим вредностима овог процесног параметра синтетичу макромолекули са приметно другачијим садржајем ацетата и пирувата (Casas et al., 2000), док мешање има доста мањи утицај (Paragianni et al., 2001). Ефекти свих осталих коефицијената регресионе једначине нису статистички значајни у интервалу

поверења од 95%. Дефинисан математички модел приказан је и графички, тродимензионалним одзивним површинама које приказују моделом предвиђену зависност анализираниг одзива од два фактора при константној вредности, а дате су на слици 5.16. (а-в).

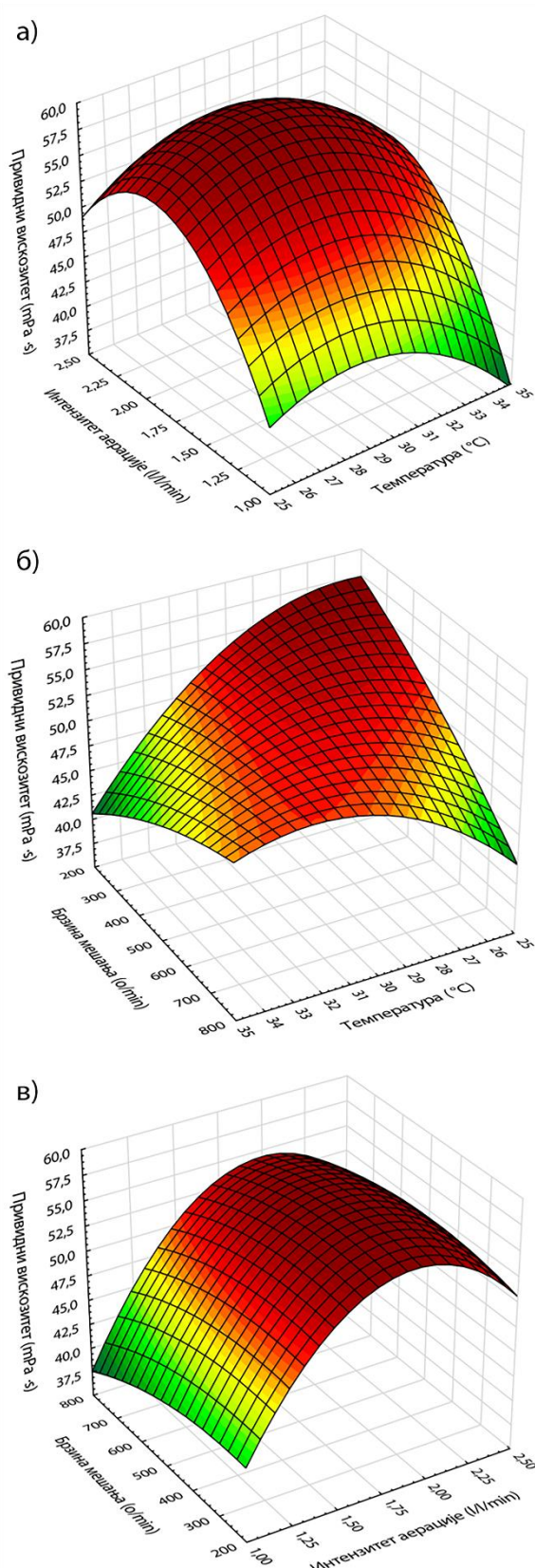
Табела 5.30. Коефицијенти регресионе једначине, њихова значајност и коефицијент детерминације за привидни вискозитет раствора ксантана

Коефицијенти	Вредност	t-вредност	p-вредност
<b>одсечак</b>			
b <sub>0</sub>	-105,920645	-1,331310	0,240556
<b>линеарни</b>			
b <sub>1</sub>	9,899571	2,040479	0,096810
b <sub>2</sub>	54,680096*	2,736461	0,040964
b <sub>3</sub>	-0,117987	-2,548912	0,051334
<b>квадратни</b>			
b <sub>11</sub>	-0,218164*	-2,772448	0,039251
b <sub>22</sub>	-17,696872*	-5,060106	0,003900
b <sub>33</sub>	-0,000021	-0,974603	0,374518
<b>интеракције</b>			
b <sub>12</sub>	0,386525	0,766886	0,477777
b <sub>13</sub>	0,004201*	3,334088	0,020686
b <sub>23</sub>	0,004970	0,591627	0,579835
R <sup>2</sup>		0,925	

\* Статистички значајан утицај ( $p < 0,05$ )

Слика 5.16. (а) приказује моделом предвиђен утицај температуре и интензитета аерације на биосинтезу ксантана жељеног квалитета при константној вредности брзине мешања (500 о/min). Представљени резултати јасно указују да се вредност посматраног одзива смањује са повећањем процесне температуре ако је проток ваздуха константан. Ово је у складу са чињеницом да се на вишим температурама синтетишу биополимери који у својој структури садрже мање ацетатних и пируватних група због чега су и њихови раствори мање вискозни (Casas et al., 2000). Са друге стране, пораст интензитета аерације, без обзира на температуру на којој се биопроцес одвија доводи до биосинтезе ксантана чији су раствори приметно вискознији што потврђују и доступни литературни подаци (Borges et al., 2008; de Jesus Assis et al., 2014). Највећа вредност посматраног одзива од око 55,0 mPa·s до 60,0 mPa·s остварује се при интензитету аерације од 1,75 l/l/min до 2,50 l/l/min ако се температура одржава у опсегу од 25°C до 32 °C.

На слици 5.16. (б) види се моделом предвиђен утицај процесне температуре и интензитета аерације на продукцију биополимера што бољег квалитета процењеног преко вискозитета његових раствора при константној вредности интензитета аерације (1,75 l/l/min). Приказани резултати показују да посматрани одзив има високе вредности у широком опсегу варираних фактора. Ипак, до биосинтезе ксантана чији су раствори најмање вискозни долази при минималној температури (од 25°C до 27°C) и максималној брзини ортања мешалице (од 700 о/min до 800 о/min) или на вишим температурама (од 33°C до 35°C) уз најмање интензивну хомогенизацију медијума (од 200 о/min до 400 о/min). При вредностима варираних фактора које су изван поменутих опсега остварују се максималне вредности посматраног одзива (од 50,0 mPa·s до 57,5).



Слика 5.16. (в) илуструје моделом предвиђен утицај интензитета аерације и брзине мешања на квалитета ксантана током његове биосинтезе при константној температури (30°C). Анализом приказане одзивне површине запажа се да при константном протоку ваздуха промена брзине мешања не утиче значајно на вредност посматраног показатеља квалитета биополимера. Међутим, ако је хомогенизација медијума уједначена уочава се да је утицај интензитета аерације идентичан као и у првобитно разматраном случају (слика 5.16. а). То значи да се биосинтеза ксантана чији раствори имају вискозитет од 50,0 mPa·s до 60,0 mPa·s постиже при протоку ваздуха од 1,75 l/l/min до 2,50 l/l/min независно од подешене брзине мешања у продукционој фази.

Слика 5.16. Привидни вискозитет раствора ксантана у функцији два фактора при константној вредности трећег:

- а) брзина мешања (500 o/min),
- б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),
- в) температура (30°C)

### 5.5.3. Оптимизација вредности процесних параметара

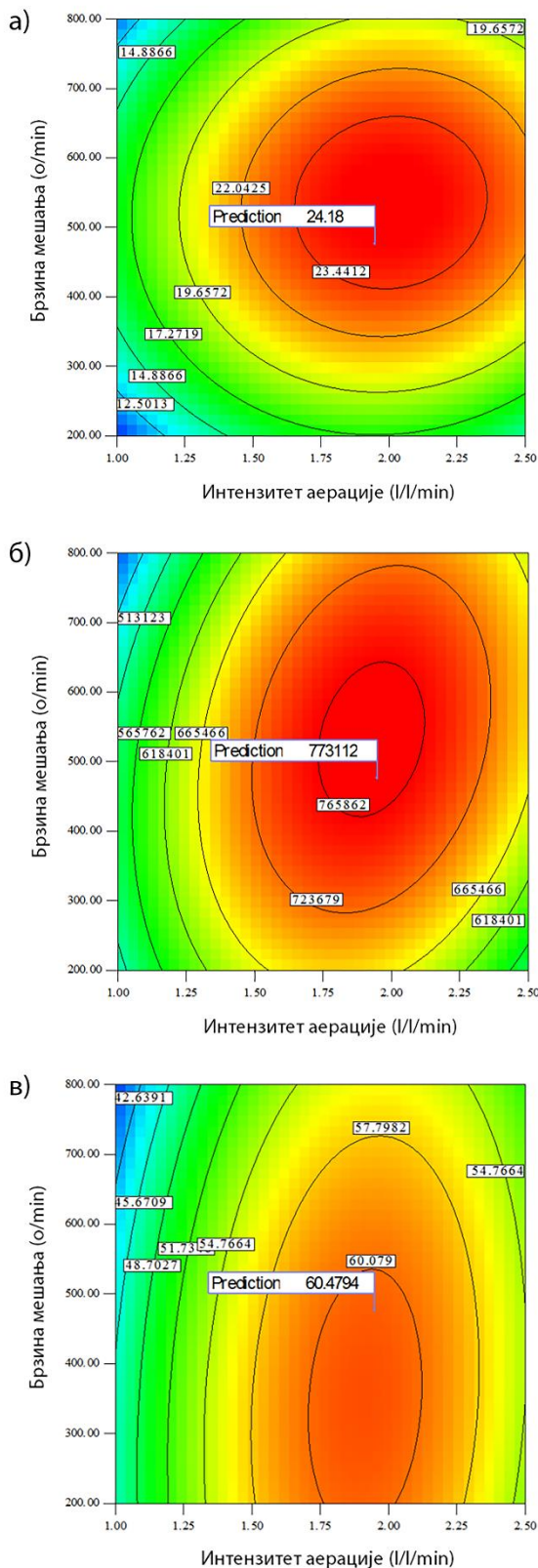
Крајни циљ примене поступка одзивне површине је оптимизација жељеног процеса, тако да добијени модели могу бити употребљени за симулацију, али и за развој производног поступка увећаних размера. За оптимизацију процеса са два или више одзива могуће је применити неколико оптимизационих поступака. Ипак, један од најчешће примењиваних је метода жељене функције која је коришћена и у оквиру ових истраживања за дефинисање оптималних вредности температуре биопроцеса, интензитета аерације и брзине мешања култивационог медијума.

С обзиром да је основни циљ биотехнолошке производње добијање што веће количине жељеног метаболита одговарајућег квалитета (Додић и Граховац, 2013) као услови оптимизације дефинисани су максимална продукција ксантана којег карактерише максимална молекулска маса, али и максималан вискозитет раствора. За дефинисане појединачне жељене функције изведена је оптимизација анализираних фактора. Оптималне вредности испитиваних параметара, као и вредности предвиђених одзива које су добијене као резултат оптимизације при задатим ограничењима приказане су у табели 5.31.

Табела 5.31. Оптималне вредности испитиваних параметара и предвиђени одзиви

Променљиве	Услови	Оптималне вредности
Температура (°C)	у опсегу	29,33
Интензитет аерације (l/l/min)	у опсегу	1,95
Брзина мешања (o/min)	у опсегу	475,54
Одзиви	Предвиђене вредности	
Садржај биомасе ( $10^8$ cfu/ml)	у опсегу	137,34
Садржај раствореног кисеоника (%)	у опсегу	10,15
Садржај шећера (g/l)	у опсегу	2,84
Садржај укупног азота (mg/l)	у опсегу	137,56
Садржај асимилабилног азота (mg/l)	у опсегу	4,78
Садржај укупног фосфора (mg/l)	у опсегу	5,18
Вискозитет култивационе течности (mPa·s)	у опсегу	237,92
Садржај ксантана (g/l)	максималан	24,18
Молекулска маса ксантана ( $10^5$ g/mol)	максималан	7,73
Вискозитет раствора ксантана (mPa·s)	максималан	60,48
<b>Укупна жељена функција</b>		<b>0,969</b>

Резултатати приказани у табели 5.31. указују да за дефинисане појединачне жељене функције максимална вредност укупне жељене функције износи 0,969. Оптималне вредности испитиваних фактора, при којима жељена функција има највећу вредност, су температура од 29,33°C, интензитет аерације од 1,95 l/l/min и брзина мешања од 475,54 o/min. Извођењем биопроцеса при овако дефинисаним условима моделом предвиђене вредности посматраних одзива су следеће: садржај биомасе од  $137,34 \cdot 10^8$  cfu/ml, садржај раствореног кисеоника од 10,15%, садржај шећера од 2,84 g/l, садржај укупног азота од 137,56 mg/l, садржај асимилабилног азота од 4,78 mg/l, садр-



Слика 5.17. Зависност појединачне жељене функције од интензитета аерације и брзине мешања при температури од 29,33°C:

- садржај ксантана,
- молекулска маса ксантана,
- вискозитет раствора ксантана

жај укупног фосфора од 5,18 mg/l, привидни вискозитет култивационе течности од 237,92 mPa·s, садржај ксантана од 24,18 g/l, молекулска маса ксантана од  $7,73 \cdot 10^5$  g/mol и привидни вискозитет раствора ксантана од 60,48 mPa·s. Оптимизациони резултати приказани су и графички, контурним дијаграмима који показују зависност одабраног одзива од два фактора при константној оптималној вредности трећег, а дати су на слици 5.17. (а-в).

Контурни дијаграм који приказује утицај интензитета аерације и брзине мешања култивационог медијума на садржај биосинтетисаног ксантана при константној оптималној температури (29,33°C) представљен је на слици 5.17. (а). Анализом приказаних резултата може се уочити да, ако је брзина ротирања мешалице константна, интензивирањем аерације долази до повећања концентрације жељеног биополимера у култивационом медијуму. Међутим, ако се проток ваздуха одржава непромењеним повећање брзине мешања има значајан утицај на вредност посматраног одзива само при интензитету аерације већем од 1,50 l/l/min. Према приказаним резултатима одабрани производни сој ће продуковати изулетно велику количину ксантана извођењем производног поступка при интензитету аерације од 1,50 l/l/min до 2,50 l/l/min и брзини мешања медијума од 400 o/min до 700 o/min.

На слици 5.17. (б) дат је контурни дијаграм који приказује утицај интензитета аерације и брзине мешања култивационог медијума на молекулску масу ксантана којег је одабрани производни сој биосинтетисао при константној оптималној температури (29,33°C). Ако се током извођења предложеног производног поступка и интензитет аерације одржава константним побољшање хомогенизације медијума не утиче значајно на биосинтезу ксантана већих молекулских маса. Међутим, када је брзина мешања непромењена може се уочити позитиван утицај повећања протока ваздуха на вредност посматраног одзива.

Дакле, извођењем биопроцеса при интензитету аерације од 1,50 l/l/min до 2,25 l/l/min и брзини мешања од 300 o/min до 750 o/min фаворизује се биосинтеза ксантана највећих молекулских маса.

Контурни дијаграм који приказује утицај интензитета аерације и брзине мешања медијума на привидни вискозитет раствора ксантана продукованог при константној оптималној температури биопроцеса (29,33°C) представљен је на слици 5.17 (в). Као и у претходном случају, када је проток ваздуха константан, интензивирање хомогенизације медијума не утиче значајно на усмеравање метаболичке активности референтног производног соја ка биосинтези квалитетнијег ксантана. Међутим, утицај аерације на продукцију ксантана одговарајућих реолошких карактеристика при константној брзини мешања нешто је другачији. Наиме, са повећањем интензитета аерације до 2,00 l/l/min долази до синтезе квалитетнијих биополимера, док са даљим повећањем протока ваздуха вредност посматраног одзива незнатно опада. Према наведеним резултатима јасно је да се ксантан чији су раствори највискознији продукује се при интензитету аерације од 1,75 l/l/min до 2,00 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min до 500 o/min.

С обзиром да се жељени степен успешности испитиваног производног поступка обезбеђује само потпуним и доследним придржавањем експериментално доказаних услова производње потребно је сумирати све добијене резултате. Дакле, максимална продукција ксантана одговарајућег квалитета постиже се култивацијом референтног соја на медијуму чија су основа отпадне воде винарија намешане тако да иницијално садрже 30 g/l шећерних компоненти. Дobar пренос масе кисеоника и одсуство зона застоја у биорекатору који су битни за високу продуктивност соја и велику молекулску масу ксантана чији раствори показују значајне вредности вискозитета омогућени су извођењем биотехнолошког процеса на температури од  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , при интензитету аерације од око 2 l/l/min и брзини мешања од 475 o/min.

#### 5.5.4. Валидација оптимизационих резултата

Да би се дефинисани математички и оптимизациони модели могли користити за пројектовање предложеног биотехнолошког процеса у увећаним размерама неопходно је проверити валидност, односно поновљивост добијених резултата. Ово подразумева извођење нове серије експеримената под тачно дефинисаним, односно оптималним условима, а затим поређење практично одређених и моделом предвиђених вредности. Ако се између ова два сета података не утврди адекватно поклапање добијени оптимизациони резултати сматрају се неодговарајућим због чега се дефинисани модел мора променити (Барас и сар., 2009).

Узимајући у обзир наведене чињенице у овој фази истраживања изведена је култивација референтног производног соја на медијуму формулисаног састава при оптималним условима варираних процесних параметара у трајању од 96 h. Дакле, у првих 24 h биопроцес се одвијао у условима оптималним за умножавање биомасе (део 4.4), а затим је температура повећана на  $29^\circ\text{C}$ , интензитет аерације на 2 l/l/min, а брзина мешања на 475 o/min. Непосредно након промене процесних услова уочено је пенушање култивационе течности које је сузбијено додатком антипенушавца, док је у каснијим фазама култивације вршена корекција вредности рН како би се поменути параметар одржао у оптималним границама (6,0-8,0) за постизање максималне продукције биополимера (Mirik et al., 2011).

Анализирајући ове и све претходно изведене огледе може се приметити да је мало оних током којих није регулисана вредност рН што упућује на чињеницу да, иако литературно препоручена као погодна (Li et al., 2012), количина додатог калцијум-карбоната генерално није довољна да у одговарајућој мери пуферише медијуме на бази отпадних вода винарија. Стога би у будућим



истраживањима требало оптимизовати количину овог агенса за пуферовање коју је потребно додати у намешане отпадне воде винарија да би се вредност рН одржала у оптималном опсегу током читавог трајања биопроцеса. Са друге стране, с обзиром да у биореакторима постоји могућност аутоматске контроле и регулације вредности рН корисно би било испитати како би се одвијао биопроцес на медијумима без додатог калцијум-карбоната, односно значајно би било утврдити колико је потребно базе за успешно извођење производног поступка у наведеним условима.

Експерименти који су имали за циљ проверу валидности оптимизационих резултата изведени су у три понављања. Током извођења сваког од њих испитан је ток биосинтезе ксантана анализом узорака култивационих течности у погледу садржаја биомасе, раствореног кисеоника, шећера, укупног и асимилабилног азота, као и укупног фосфора. Од момента промена услова вршена су и реолошка мерења са циљем праћења привидног вискозитета култивационог медијума, издвајан је синтетисани биополимер и одређивана је његова молекулска маса. Промена свих наведених параметара била је уобичајена за успешно изведен биотехнолошки процес.

Испитивањем тока култивације одабраног производног соја при оптималним условима утврђено је да се садржај биомасе у култивационим медијумима непосредно по инокулацији налазио у опсегу од  $11 \cdot 10^8$  cfu/ml до  $13 \cdot 10^8$  cfu/ml. Ово је забележено и код извођења биосинтезе ксантана при различитим процесним условима, а указује на уједначеност квалитета припремљених инокулума. Међутим, за стабилан биопроцес са предвидивим исходом довољно је да почетни садржај биомасе износи  $10^6$ - $10^8$  cfu/ml (Пејин, 2003) што је за минимум један ред величине мање у односу на број ћелија које се доносе инокулумом припремљеним на начин који је објашњен у делу 4.3. ове докторске дисертације. Имајући у виду да трошкови припреме инокулума учествују у укупним трошковима биотехнолошке производње у наставку истраживања свакако би се требало позабавити овим проблемом. Као могући приступи за проналажење одговарајућег решења предлажу се оптимизација количине инокулума која се додаје у медијум, испитивање могућности примене веома јефтиног производног медијума на бази отпадних вода винарија за последњу фазу умножавања ћелија, као и испитивање успешности извођења биосинтезе ксантана при условима оптималним за продукцију биополимера од самог почетка биопроцеса.

По завршетку биосинтезе медијуми су анализирани у погледу параметара којима је испраћен ток култивације, а одређен је и привидни вискозитет раствора издвојеног биополимера. Резултати ових одређивања указују да је извођењем производне фазе биопроцеса при дефинисаним процесним условима добијена култивациона течност са 23,85 g/l ксантана одговарајућег квалитета чиме је остварен степен конверзије извора угљеника у производ од 79,17%, док садржај раствореног кисеоника није опао испод критичне вредности. Ради лакшег поређења све експериментално одређене и моделом предвиђене вредности анализираних параметара приказане су у табели 5.32. У истој табели дат је и степен поклапања представљених резултата.

Резултати приказани у табели 5.32. указују да су експериментално одређене вредности за све испитиване параметре веома уједначене што је резултат успешно вођеног производног поступка. Ово је веома важно како на лабораторијском, тако и на индустријском нивоу јер се тиме обезбеђује одговарајућа поновљивост резултата код извођења серија са великим бројем идентичних експеримената. Поређењем моделом предвиђених вредности и средњих вредности експериментално добијених резултата може се уочити да је степен поклапања већи од 90% за све анализиране одзиве. Овим је доказана адекватност предложеног оптимизационог модела којим су дефинисане вредности процесне температуре, интензитета аерације и брзине мешања медијума за биосинтезу ксантана на намешаним отпадним водама винарија применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951.

Табела 5.32. Поређење експерименталних и моделом предвиђених вредности

Параметар	Експерименталне вредности				Предвиђене вредности	Степен поклапања (%)
	I сет	II сет	III сет	Средња вредности		
X ( $10^8$ cfu/ml)	138,00	142,00	141,00	140,33±2,08	137,34	97,87
O <sub>2</sub> (%)	10,03	11,20	12,06	11,10±1,02	10,15	91,44
S (g/l)	2,54	2,39	2,91	2,61±0,27	2,84	91,90
N <sub>uk</sub> (mg/l)	138,42	141,14	137,25	138,94±2,00	137,56	99,01
N <sub>as</sub> (mg/l)	4,25	4,31	4,96	4,51±0,39	4,78	94,35
P <sub>uk</sub> (mg/l)	5,47	5,12	5,99	5,53±0,44	5,18	93,67
$\eta_a$ (mPa·s)	244,50	236,10	242,78	241,13±4,44	237,92	98,67
P (g/l)	24,25	23,85	23,44	23,85±0,41	24,18	98,64
M <sub>w</sub> ( $10^5$ g/mol)	7,70	7,74	7,77	7,74±0,04	7,73	99,87
$\eta_a^P$ (mPa·s)	61,20	60,95	60,12	60,76±0,57	60,4	98,82

Будући да су оптимизацијом производње ксантана на лабораторијском нивоу добијени валидни резултати они представљају основне податке за пројектовање биопроцеса увећаних размера што води ка потенцијалној индустријализацији предложеног производног постука. Значајно је напоменути да су вредности процесних параметара одговорних за растворљивост кисеоника оптимизоване за биореактор тачно дефинисаних геометријских односа у којем се мешање изводи помоћу две паралелно постављене Руштонове турбине (део 4.4). С обзиром да би наставак истраживања подразумевао испитивање успешности извођења биопроцеса у већим запреминама неопходно је користити биореакторе идентичних конструкционих карактеристика.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

---

Истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом проистекла су из потреба за решавањем проблема биотехнолошке производње ксантана у погледу великих захтева за процесном водом и отежане регулације услова биосинтезе услед драстичног повећања вискозитета култивационог медијума током извођења биопроцеса, али и за проналаском одговарајућег третмана за уклањање загађујућих материја из отпадних вода винарија чије се генерисање у нашем региону интензивира. Оптимизацијом производње ксантана у лабораторијском биореактору одговарајућих геометријских односа укупне запремине 7 l, метаболичком активношћу референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на култивационом медијуму формулисаног састава чија су основа отпадне воде винарија дефинисане су оптималне вредности процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника. Извођењем производне фазе биопроцеса на температури од 29°C, при интензитету аерације од 2 l/l/min и брзини мешања од 475 o/min добијен је садржај ксантана, одговарајућег квалитета, од 23,85 g/l при чему је остварен степен конверзије извора угљеника у производ од 79,17%, док садржај раствореног кисеоника није опао испод критичне вредности. Са технолошког аспекта, резултати ових истраживања представљају поуздан извор информација за увећање размера предложеног биопроцеса и пројектовање биореактора одговарајућих карактеристика.

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

- Резултати прелиминарних истраживања која су обухватала скрининг могућности биосинтезе ксантана применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на отпадним водама различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина без разблаживања и додатног обогаћивања указују да сви поменути ефлуенти имају потенцијал примене у предложеном биопроцесу. На основу реолошких карактеристика култивационих течности и садржаја биополимера потврђена је могућност биосинтезе ксантана у примењеним условима, а како се метаболичка активност одабраног соја на отпадним водама без претходног третмана несметано одвијала није уочен негативан ефекат евентуално присутних ометајућих фактора.
- Карактеризацијом прикупљених ефлуената утврђено је да отпадне воде из различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина које се генеришу на територији Фрушкогорског рејона по свом саставу представљају погодне сировине за припрему медијума за производњу ксантана. У зависности од садржаја нутријената које захтева предложени биотехнолошки процес анализирани отпадне воде подељене су у две групе. У прву групу сврстани су ефлуенти који садрже све нутријенте неопходне за формулисање подлоге за биосинтезу ксантана, док су на другој страни груписане отпадне воде које се могу користити као извор азота, фосфора, минералних материја и као процесна вода, док је за неометану синтезу биополимера неопходно додати одговарајућу количину извора угљеника. На основу ових, као и резултата прелиминарних истраживања, дефинисан је поступак припреме медијума за биосинтезу ксантана који је подразумевао само корекцију садржаја извора угљеника, додаток средства за пуферовање, подешавање вредности рН и стерилизацију.

- Испитивањем тока култивације референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 у лабораторијском биореактору на појединачним отпадним водама из различитих фаза производње белог, розе и црвеног вина селектоване су сировине са највећим потенцијалном примене у испитиваном биопроцесу. Посматрајући садржај биосинтетисаног ксантана и вредности конверзија нутријената значајних за биотехнолошку производњу, али и састав коришћених сировина, као најпогодније одабране су отпадне воде које се генеришу током прања муљаче, пресе и танка након бистрења шире јер се њиховим намешавањем, које је могуће будући да се генеришу у веома кратком временском периоду, могу добити адекватни медијуми и то без утрошка водоводске воде за разблаживање и чистих хемикалија за обогаћивање. На основу промене садржаја нутријената у медијумима током бисинтезе ксантана утврђено је да у последњих 24 h култивације не долази до њихове значајне потрошње због чега је укупно време трајања биопроцеса дефинисано на 96 h.
- Резултати испитивања тока биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на отпадним водама из одабраних фаза производње белог и розе вина намешаним тако да иницијално садрже 50 g/l редукујућих шећера потврђују могућност извођења предложеног биопроцеса на наведеним медијумима. На основу промене садржаја нутријената, показатеља успешности биопроцеса, али и веома богатог нутритивног састава сировина утврђено је да се намешавањем отпадних вода од прања муљаче, пресе и танка након бистрења шире флотацијом добијају веома вредни медијуми који би се, уз додатну оптимизацију биопроцеса, могли успешно примењивати за производњу ксантана.
- Формулација састава култивационог медијума чија су основа намешане отпадне воде из одабраних фаза производње белог и розе вина изведена је применом основних статистичких техника, а обухватала је дефинисање оптималног почетног садржаја шећера за биосинтезу ксантана применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951. Да би се остварила максимална продукција ксантана одговарајућег квалитета уз максимално искоришћење супстрата отпадне воде морају бити намешане тако да садрже 30 g/l шећерних компоненти. Испитивањем тока биосинтезе ксантана на медијумима оптималне формулације у лабораторијском биореактору укупне запремине 3 l утврђено је да се на отпадним токовима из производње белог вина биосинтетише значајно већа количина ксантана бољег квалитета.
- Математички модели који описују утицај процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника на показатеље тока (садржај биомасе, садржај раствореног кисеоника, садржај шћера, садржај укупног азота, садржај асимилабилног азота, садржај укупног фосфора), као и на показатеље успешности биосинтезе ксантана (вискозитет култивационе течности, садржај ксантана, молекулска маса ксантана, вискозитет раствора ксантана) применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на медијуму формулисаног састава дефинисани су применом поступка одзивне површине, а на основу резултата експеримената изведених у лабораторијском биореактору укупне запремине 7 l при различитим вредностима температуре (25-35°C), интензитета аерације (1,00-2,50 l/l/min) и брзине мешања (200-800 o/min) варираним у складу са Бокс-Бенкеновим експерименталним планом. Анализом варијансе утврђено је да су сви дефинисани модели статистички значајни у интервалу поверења од 95% ( $p < 0,05$ ), док веома високе вредности коефицијената детерминације ( $R^2 > 0,909$ ) указују на адекватно репрезентовање параметара биопроцеса математичким зависностима.
- Оптимизација вредности процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника изведена је применом методе жељене функције у комбинацији са дефинисаним математичким моделима. Као услови задати су максимална продукција ксантана којег карактерише максимална молекулска маса, али и максималан вискозитет раствора. Дефинисане оптималне вредности испитиваних фактора, при којима жељена функција има највећу вредност (0,969), су температура од 29,33°C, интензитет аерације од 1,95 l/l/min и брзина мешања од 475,54 o/min,

док су моделом предвиђене вредности показатеља тока, као и показатеља успешности биосинтезе ксантана следеће: садржај биомасе од  $137,34 \cdot 10^8$  cfu/ml, садржај раствореног кисеоника од 10,15%, садржај шећера од 2,84 g/l, садржај укупног азота од 137,56 mg/l, садржај асимилабилног азота од 4,78 mg/l, садржај укупног фосфора од 5,18 mg/l, вискозитет култивационе течности од 237,92 mPa·s, садржај ксантана од 24,18 g/l, молекулска маса ксантана од  $7,73 \cdot 10^5$  g/mol и вискозитет раствора ксантана од 60,48 mPa·s. Извођењем биосинтезе ксантана применом референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на медијуму дефинисаног састава при оптималним процесним условима утврђен је степен поклапања моделом предвиђених и експериментално добијених резултата већи од 90% чиме је потврђена валидност и поновљивост оптимизационих резултата.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

---

Током израде ове докторске дисертације као релевантни извори података коришћени су доступни оригинални и прегледни научни радови, стручне књиге, саопштења са међународних научно-стручних скупова, докторске дисертације, магистарске тезе, као и важеће уредбе и правилници. Списак свих литературних навода дат је у наставку овог поглавља.

- Agustina TE, Ang HM, Pareek VK (2008): Treatment of winery wastewater using a photocatalytic/photolytic reactor. *Chemical Engineering Journal*, 135:151-156.
- Allen TT (2006): Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems, Springer.
- Allman AR (2012): Bioreactors: Design, Operation, and Applications. In: *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, El-Mansi E.M.T., Bryce C.F.A., Dahhou B., Sanchez S., Demain A.L., Allman A.R. (Eds.), 3<sup>rd</sup> Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp 417-455.
- Amanullah A, Serrano-Carreón L, Castro B, Galindo E, Nienow AW (1998b): The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 57:95-108.
- Amanullah A, Tuttien B, Nienow AW (1998): Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 57:198-210.
- Anbuselvi S, Sathish Kumar M, Vikram M, Padmaja (2012): A comparative study on biosynthesis of xanthan gum using three different *Xanthomonas* strains isolated from diseased plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3:B1-B6.
- Arienzo M, Christen EW, Quayle W, Kumar A (2009): A review of the fate of potassium in the soil-plant system after land application of wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, 164:415-422.
- Atiya ZY (2012): Estimation of volumetric mass transfer coefficient in bioreactor. *Al-Khwarizmi Engineering Journal*, 8:75-80.
- Bajić B, Dodić J, Rončević Z, Grahovac J, Dodić S, Vučurović D, Tadijan I (2014): Biosynthesis of xanthan gum on wastewater from confectionary industry. *Analecta*, 8:13-17.
- Bajić B, Rončević Z, Puškaš V, Miljić U, Dodić S, Grahovac J, Dodić J (2015): White wine production effluents used for biotechnological production of Xanthan. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 19:52-55.
- Bajić BŽ, Rončević ZZ, Dodić SN, Grahovac JA, Dodić JM (2015b): Glycerol as a carbon source for xanthan production by *Xanthomonas campestris* isolates. *Acta Periodica Technologica*, 46:197-206.

- Барас Ј, Вељковић В, Попов С, Повреновић Д, Лазић М, Златковић Б (2009): Основи биопроцесног инжењерства, Универзитет у Нишу, Технолошки факултет Лесковац, Лесковац.
- Baş D, Boyacı IH (2007): Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78:836–845.
- 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.
- Borges CD, de Paula RCM, Feitosa JPA, Vendruscolo CT (2009): The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv *pruni* strain 106. *Carbohydrate Polymers*, 75:262-268.
- Borges CD, Moreira ADS, Vendruscolo CT, Ayub MAZ (2008): Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. *Revista Argentina de Microbiología*, 40:81-85.
- Bories A, Sire Y (2010): Impacts of winemaking methods on wastewaters and their treatment. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31:38-44.
- Born K, Langendorff V, Boulenguer P.(2005): Xanthan. In: *Polysaccharides and polyamides in the food industry*, Volume I, Steinbüchel A, Rhee SK (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 259-291.
- Brandão LV, Assis DJ, López JA, Espiridião MCA, Echevarria EM, Druzian JI (2013): Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30:737-746.
- Brereton RG (2003): *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons Ltd.
- 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*, Oreopoulou V, Russ W (Eds.), Springer Science, New York, pp. 109-133.
- Бугарски БМ (2014): Пројектовање процеса и уређаја у биотехнологији и биохемијском инжењерству. Академска Мисао, Београд.
- Bustamante MA, Paredes C, Moral R, Moreno-Caselles J, Pérez-Espinosa A, Pérez-Murcia MD (2005): Uses of winery and distillery effluents in agriculture: characterisation of nutrient and hazardous components. *Water Science and Technology*, 51:145-151.
- 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.
- Chan YJ, Chong MF, Law CL, Hassell DG (2009): A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 155:1-18.
- Chapman J, Baker P, Wills S (2001): *Winery Wastewater Handbook*. Winetitles, Adelaide, SA.
- Chavan S, Baig MMV (2016): Relationship of biomass and xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*: optimization of parameters. *British Biotechnology Journal*, 11:1-8.

- Conradie A, Sigge GO, Cloete TE (2014): Influence of winemaking practices on the characteristics of winery wastewater and water usage of wineries. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35:10-19.
- Costa N, Lourenço J, Pereira Z (2011): Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 107:234-244.
- Далмација Б (2010): Локални водоводи у Војводини – садашње стање и предлог мера. Удружење за технологију воде и санитарно инжењерство, Београд.
- Day P, Cribb APJ, Boland AM, Shanahan M, Oemcke D, Kumar A, Cowey G, Forsyth K, Burgi A (2011): *Winery Wastewater Management & Recycling: Operational Guidelines*. Grape and Wine Research and Development Corporation, Adelaide, SA.
- de Heredia B, Torregrosa J, Dominguez JR, Partido E (2005): Degradation of wine distillery wastewaters by the combination of aerobic biological treatment with chemical oxidation by Fenton's reagent. *Water Science and Technology*, 51:167-174.
- de Jesus Assis D, Brandão LV, de Sousa Costa LA, Figueiredo TVB, Sousa LS, Padilha FF, Druzian JI (2014): A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172:2769-2785.
- de Sousa Costa LA, Campos MI, Druzian JI, de Oliveira AM, de Oliveira Junior EN (2014): Biosynthesis of xanthan gum from fermenting shrimp shell: yield and apparent viscosity. *International Journal of Polymer Science*, 1-8.
- Devesa-Rey R, Vecino X, Varela-Alende JL, Barral MT, Cruz JM, Moldes AB (2011): Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 21:2327-2335.
- Додић Ј (2000): Прилог проучавању биосинтезе ксантана, Магистарска теза, Технолошки факултет Нови Сад.
- Додић Ј., Граховац Ј. (2013): Индустриска микробиологија: практикум, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.
- Dodić JM, Rončević ZZ, Bajić BŽ, Grahovac JA, Dodić SN (2013): Possibility of xanthan production on glycerol containing media. *Book of proceedings, Food Science Conference 2013, Budapest, Hungary*.
- Dodić JM, Vučurović DG, Grahovac JA, Dodić SN, Popov SD, Jokić AI (2011): Utilization of maltose enriched spent grains liquor for xanthan production. *Acta Periodica Technologica*, 42:211-221.
- Додић ЈМ, Рончевић ЗЗ, Граховац ЈА, Бајић БЖ, Королија ОС (2015): Биосинтеза компоненти антифунгалног деловања према *Aspergillus* spp. применом *Streptomyces hygrosopicus*. *Хемијска Индустрија*, 69:201-208.
- Додић С, Попов С: Биопроцесна опрема, Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад.
- Ђурић С (2015): Практична искуства у преради воде. Зборник Радова, "XX Саветовање о биотехнологији", 20:253-262.
- El Enshasy H, Then C, Othman NZ, Al Homosany H, Sabry M, Sarmidi MR, Aziz RA (2011): Enhanced xanthan production process in shake flasks and pilot scale bioreactors using industrial semi-defined medium. *African Journal of Biotechnology*, 10:1029-1038.



- EPA SA (2004): EPA Guidelines for wineries and distilleries, Environment Protection Authority, Adelaide SA.
- Faria S, Petkowicz CLO, de Morais SAL, Terrones MGH, de Resende MM, de Franc FP, Cardoso VL (2011): Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymers* 86:469-476.
- Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL (2007): Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597:179-186.
- Franson M.A.H. editor (1998): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, D.C.
- Funahashi H, Yoshida T, Taguchi H (1987): Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation Technology*, 65:603-606.
- Gahruie HH, Moosavi-Nasab M, Ziaee E (2015): Application of response surface methodology for xanthan gum and biomass production using *Xanthomonas campestris*. *Journal of Chemical Health Risks*, 5:167-177.
- Gales ME Jr, Julian EC, Kroner RC (1966): Method for quantitative determination of total phosphorus in water. *Journal of the American Water Works Association*, 58:1363-1368.
- Galitsky C, Worrell E, Radspeiler A, Vineyards F, Healy P, Zechiel S (2005): *Best Winery Guidebook: Benchmarking and Energy and Water Savings Tool for the Wine Industry*. University of California, Berkeley, CA.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E (2009): Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27:153-176.
- García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E (2000): Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18:549-579.
- García-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*, 14:991-996.
- 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*, 3:15-23.
- Gilani SL, Heydarzadeh HD, Mokhtarian N, Alemian A, Kolaei M (2011): Effect of preparation conditions on xanthan gum production and rheological behavior using cheese whey by *Xanthomonas campestris*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5:855-859.
- Gilani SL, Najafpour GD, Heydarzadeh HD, Zare H (2011b): Kinetic models for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* from molasses. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 17:179-187.
- Gomashe AV, Dharmik PG, Fuke PS (2013): Optimization and production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1449 from sugar beet molasses. *The International Journal of Engineering and Science*, 2:52-55.
- Граховац Ј (2011): Оптимизација добијања етанола ферментацијом међупроизвода технологије прераде шећерне репе, Докторска дисертација, Технолошки факултет Нови Сад.

- He F, Liang NN, Mu L, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ (2012): Anthocyanins and their variation in red wines I. monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17:1571-1601.
- Heirlich K (1990): Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15<sup>th</sup> Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, pp. 758–759.
- Хоџић Е, Хоџић Е (2014): Моделирање и симулација структура комплексних производних система. *Technical Journal*, 8:150-156.
- Hsu CH (2003): Characterization of a centrifugal, packed-bed reactor for xanthan gum production. PhD, thesis, 2003.
- Ioannou LA, Puma GL, Fatta-Kassinos D (2015): Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 286:343-368.
- Илић Ђ, Мијаиловић С (2014): Регресиона анализа параметара у процесу унапређења одлучивања. *Трендови у пословању*, 2:25-32.
- Јакшић Д, Иванишевић Д, Ђокић В, Брбаклић Тепавац М (2015): Вински атлас. Републички завод за статистику, Београд.
- Jansson P, Kenne L, Lindberg B (1975): Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45 (1) 275-282.
- Јевремовић В (2009): Вероватноћа и статистика, Математички факултет, Београд.
- Јокић А (2010): Моделовање „cross-flow“ микрофилтрације суспензија квасца применом концепта неуронских мрежа и поступка одзивне површине, Докторска дисертација, Технолошки факултет Нови Сад.
- 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*, 39:249-256.
- Khosravi-Darani K, Reyhani FS, NaserNejad B, Farhadi GBN (2001): 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.
- Kongruang S (2006): Aeration rate effect in xanthan production by *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 on synthetic and sugar cane medium. *NU Science Journal*, 2:121-130.
- Kumar A, Frost P, Correll R, Oemcke D (2008): Winery wastewater generation, treatment and disposal: A survey of Australian practice. *Archives of Applied Science Research*, 4:2507-2512
- Kumara SM, Khan BA, Rohit KC, Purushotham B (2012): Effect of carbon and nitrogen sources on the production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* isolated from soil. *Archives of Applied Science Research*, 4:2507-2512.
- 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.
- Leela JK, Sharma G (2000): Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 23:687-689.
- Letisse F, Chevallereau P, Simon JL, Lindley N (2002): The influence of metabolic network structures and energy requirements on xanthan gum yields. *Journal of Biotechnology*, 99:307-317.

- 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.
- Li Q, Yan W, Yang K, Wen Y, Tang JI (2012): Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 using cassava starch as carbon source. *African Journal of Biotechnology*, 11:13809-13813.
- Li Z, Zhang Q, Xu S (2009): Effect of agitator speed and dissolved oxygen on xanthan fermentation. *Food Science*, 30:253-257.
- 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.
- López MJ, Moreno J, Ramos-Cormenzana R (2001): The effect of olive mill wastewaters variability on xanthan production. *Journal of Applied Microbiology*, 90:829-835.
- Lopez MJ, Ramos-Cormenzana A (1996): Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 263-270.
- Malandra L, Wolfaardt G, Zietsman A, Viljoen-Bloom M (2003): Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Research*, 37:4125-4134.
- Mark HF (2014): *Encyclopedia of polymer science and technology*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken New Jersey.
- Марков СЛ, Додић ЈМ, Цветковић ДД, Милошевић СБ, Марјановић ВЈ, Додић СН (2000); Биосинтеза ксантана на обогаћеној води од испирања тропа, *Acta Periodica Technologica*, 31:559-565.
- Milas M, Rinaudo M, Tinland B (1985): The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin*, 14:157-164.
- Miller GL (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- Miljić U, Rončević Z, Bajić B, Puškaš V, Dodić J: Xanthan production as a possibility of wine industry wastewaters utilization, 7th International Conference on Green Sustainable Chemistry, 5-8<sup>th</sup> July 2015, Tokyo, Japan, p.363.
- 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. *The Food Science and Biotechnology*, 20:1243-1247.
- Montalvo S, Guerrero L, Rivera E, Borja R, Chica A, Martín A (2010): Kinetic evaluation and performance of pilot-scale fed-batch aerated lagoons treating winery wastewaters. *Bioresource Technology*, 101:3452-3456.
- 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*, 44:1244-1247.
- Moosavi-Nasab M, Forghani Z, Hessam F, Maghrebi S, Abdi M (2014): Optimization of fermentation conditions of *Xanthomonas campestris* to increase the production efficiency of xanthan gum via the

- Response Surface Methodology. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3:229-233.
- 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*, 57: 521-524.
  - Moshaf S, Hamidi-Esfahani Z, Azizi MH (2014): Statistical optimization of xanthan gum production and influence of airflow rates in lab-scale fermentor. *Applied Food Biotechnology*, 1:17-24.
  - 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.
  - Murugesan AG, Dhevahi B, Gowdhaman D, Bala Amutha K, Sathesh Prabu C (2012): Production of xanthan employing *Xanthomonas campestris* using sugarcane molasses. *American Journal of Environmental Engineering*, 2:31-34.
  - Nakajima S, Funahashi H, Yoshida T (1990): Xanthan gum production in a fermentor with twin impellers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70:392-397.
  - Nerantzis ET, Tataridis P (2006): Integrated enology – utilization of winery wastes for the production of high added value products. *e-Journal of Science & Technology*, 1:79-89.
  - Nery TBR, da Cruz AJG, Druzian JI (2013): Use of green coconut shells as an alternative substrate for the production of xanthan gum on different scales of fermentation. *Polímeros*, 23:602-607.
  - NSD (2009): Winery Waste Management – Technical Memorandum, Napa Sanitation District, USA.
  - Okafor N (2007): *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Science Publishers, USA.
  - Oliveira M, Duarte E (2014): Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 1-9.
  - Oliveira M, Queda C, Duarte E (2009): Aerobic treatment of winery wastewater with the aim of water reuse. *Water Science & Technology*, 1217-1223.
  - Öner ET (2013): Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In: *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*, Fang Z (Ed.) Springer, Berlin, Germany.
  - Palaniraj A, Jayaraman V (2011): Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 106:1-12.
  - Papagianni M, Psomas SK, Batsilas L, Paras SV, Kyriakidis DA, Liakopoulou-Kyriakides M (2001): Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37:73-80.
  - Пејин Д (2003): *Индустријска микробиологија*, Технолошки факултет Нови Сад, Нови Сад.
  - Pérez-Correa R, Agosin E (2002): Instrumentation and control of bioprocesses. In: *Encyclopedia of Life Support Systems, Biotechnology*, Doelle H.W., E. J. DaSilva (Eds.), Vol. 2: *Methods in Biotechnology* (Eds. Mitchell D.A., Contin A.)
  - Peters HU, Herbst H, Hesselink PGM, Lünsdorf H, Schumpe A, Deckwer WD (1989): The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 34:1393-1397.
  - Попов С (2007): Биотехнологија – изазов за прехранбenu индустрију. *Хемијска Индустрија*, 61:246-250.

- Правилник о категоријама, испитивању и класификацији отпада, "Службени гласник РС", бр. 56/10 од 18.08.2010.
- Psomas SK, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA (2007): Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35:273-280.
- Puškaš V, Miljić U, Bajić B, Rončević Z, Dodić J (2015): Characterisation of wastewaters from different stages of wine production. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 19:136-138.
- Reis EC, Almeida M, Cardoso JC, de A. Pereira M, de Oliveira CBZ, Venceslau EM, Druzian JI, Mariano R, Padilha FF (2010): Biopolymer synthesized by strains of *Xanthomonas* sp isolate from Brazil using biodiesel-waste. *Macromolecular Symposia*, 296:347-353.
- Републички завод за статистику (<http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/>).
- Рончевић З, Бајић Б, Граховац Ј, Додић С, Пушкаш В, Миљић У, Додић Ј: Биосинтеза ксантана на отпадним водама винарије. Зборник радова, XI Симпозијум "Савремене технологије и привредни развој", Лесковац, Србија.
- 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*, 2:150-153.
- Rončević ZZ, Bajić BŽ, Grahovac JA, Dodić SN, Dodić JM (2014): Effect of the initial glycerol concentration in the medium on the xanthan biosynthesis. *Acta Periodica Technologica*, 45:239-246.
- Rončević ZZ, Bajić BŽ, Vučurović DG, Dodić SN, Grahovac JA, Dodić JM (2016): Xanthan production on wastewaters from wine industry. *Hemijaska Industrija*, DOI:10.2298/HEMIND160401025R.
- Rosalam S, England R (2006): Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:197-207.
- Roseiro JC, Esgalhado ME, Amaral Collaço MT, Emery AN (1992): Medium development for xanthan production. *Process Biochemistry*, 27:167-175.
- 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.
- Salamone JC (1996): *Polymeric materials encyclopedia*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Савић Д (2007): Индустијска микробиологија I – концепти и анаеробни микробиолошки процеси, Технолошки факултет у Лесковцу, Лесковац.
- Savvides AL, Katsifas EA, Hatzinikolaou DG, Karagouni AD (2012): Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2759-2764.
- Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC (2006): Xanthan gum - a boon to food industry. *Food Promotion Chronicle*, 1:27-30.
- Shehni SA, Soudi MR, Hosseinkhani S, Behzadipour N (2011): Improvement of xanthan gum production in batch culture using stepwise acetic acid stress. *African Journal of Biotechnology*, 10:19425-19428.
- Sherley KI, Priyadharshini RD (2015): Review on production of xanthan gum in batch and continuous reactors. *International Journal of ChemTech Research*, 8:711-717.

- Singh RP, Heldman DR (2009): Introduction to Food Engineering, Elsevier Inc., China.
- Singleton VL, Orhofer R, Lamuela-Raventos RM (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299:152-178.
- Souw P, Demain AL (1979): Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Applied and Environmental Microbiology*, 37:1186-1192.
- Strong PJ (2008): Fungal remediation and subsequent methanogenic digestion of sixteen winery wastewaters. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29:85-93.
- Timoschenko LV (1999): The Basics of Biotechnology - Textbook., Tomsk Polytechnic University, Tomsk.
- Уредба о граничним вредностима емисије загађујућих материја у воде и роковима за њихово достизање, "Службени гласник РС", бр. 48/12 од 11.05.2012.
- van Schoor LH (2005): Guidelines for the management of wastewater and solid waste at existing wineries, Winetech, Australia.
- Vlyssides AG, Barampouti EM, Mai S (2005): Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science and Technology*, 51:53-60.
- Врбашки Љ, Марков С (1992): Практикум из микробиологије, Прометеј, Нови Сад.
- Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G (2001): *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science, London UK.
- Zeng-sheng L, Qing Z, Shi-ai X (2009): Effects of agitator speed and dissolved oxygen on xanthan fermentation. *Food Science*, 30:253-257.
- 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.
- 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.

## 8. ПРИЛОЗИ

---

## 8.1. Прилог 1

Табела 8.1. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње белог вина

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	$p$ -вредност
P (g/l)	отпадна вода	94,482	4	23,621	171,247	< 0,000001
	грешка	1,379	10	0,138		
K <sub>P/S</sub> (%)	отпадна вода	1484,088	4	371,022	140,970	< 0,000001
	грешка	26,319	10	2,631		
K <sub>S</sub> (%)	отпадна вода	1639,932	4	409,983	58,521	0,000001
	грешка	70,057	10	7,005		
K <sub>N</sub> (%)	отпадна вода	2077,890	4	519,472	141,276	< 0,000001
	грешка	36,770	10	3,677		
K <sub>P</sub> (%)	отпадна вода	797,394	4	199,348	30,690	0,000014
	грешка	64,954	10	6,495		

Табела 8.2. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње розе вина

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	$p$ -вредност
P (g/l)	отпадна вода	187,045	4	46,761	139,094	< 0,000001
	грешка	3,362	10	0,336		
K <sub>P/S</sub> (%)	отпадна вода	3031,474	4	757,868	912,599	< 0,000001
	грешка	8,305	10	0,830		
K <sub>S</sub> (%)	отпадна вода	537,711	4	134,428	22,625	0,000054
	грешка	59,415	10	5,941		
K <sub>N</sub> (%)	отпадна вода	979,568	4	244,892	21,812	0,000063
	грешка	112,276	10	11,228		
K <sub>P</sub> (%)	отпадна вода	186,750	4	46,687	18,925	0,000117
	грешка	24,670	10	2,467		



Табела 8.3. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа отпадне воде из производње црвеног вина

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
P (g/l)	отпадна вода	79,904	2	39,952	145,873	0,000008
	грешка	1,643	6	0,274		
K <sub>P/S</sub> (%)	отпадна вода	1154,310	2	577,155	120,360	0,000014
	грешка	28,771	6	4,795		
K <sub>S</sub> (%)	отпадна вода	2217,487	2	1108,743	197,630	0,000003
	грешка	33,661	6	5,610		
K <sub>N</sub> (%)	отпадна вода	1402,553	2	701,276	499,836	< 0,000001
	грешка	8,418	6	1,403		
K <sub>P</sub> (%)	отпадна вода	59,754	2	29,877	7,784	0,021532
	грешка	23,031	6	3,838		

Табела 8.4. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима чија су основа намешане отпадне воде из производње белог и розе вина

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
P (g/l)	отпадна вода	141,720	1	141,720	408,937	0,000035
	грешка	1,386	4	0,347		
K <sub>P/S</sub> (%)	отпадна вода	629,965	1	629,965	1901,877	0,000002
	грешка	1,325	4	0,331		
K <sub>S</sub> (%)	отпадна вода	354,816	1	354,816	169,644	0,000201
	грешка	8,366	4	2,092		
K <sub>N</sub> (%)	отпадна вода	15,290	1	15,290	27,521	0,006314
	грешка	2,222	4	0,556		
K <sub>P</sub> (%)	отпадна вода	2708,058	1	2708,058	11243,262	< 0,000001
	грешка	0,963	4	0,241		

Табела 8.5. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана на медијумима формулисаног састава

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
P (g/l)	отпадна вода	0,416	1	0,416	2,886	0,164581
	грешка	0,577	4	0,144		
S (g/l)	отпадна вода	0,286	1	0,286	0,568	0,493042
	грешка	2,015	4	0,504		
M <sub>w</sub> (10 <sup>5</sup> g/mol)	отпадна вода	0,025	1	0,025	1,307	0,316690
	грешка	0,077	4	0,019		
η <sub>a</sub> <sup>P</sup> (mPa·s)	отпадна вода	5,171	1	5,171	2,047	0,225782
	грешка	10,106	4	2,527		

Табела 8.6. Једнофакторијална анализа варијансе садржаја шећера током биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава чија су основа отпадне воде из производње белог вина

t (h)	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
0	метода	7,547	1	7,547	6,641	0,061520
	грешка	4,545	4	1,136		
6	метода	7,024	1	7,024	6,239	0,066918
	грешка	4,503	4	1,126		
12	метода	1,741	1	1,741	1,503	0,287474
	грешка	4,634	4	1,158		
18	метода	1,281	1	1,281	1,359	0,308513
	грешка	3,770	4	0,942		
24	метода	2,676	1	2,676	7,555	0,051444
	грешка	1,417	4	0,354		
30	метода	1,531	1	1,531	3,053	0,155507
	грешка	2,006	4	0,502		
36	метода	0,910	1	0,910	0,829	0,414048
	грешка	4,392	4	1,098		
42	метода	1,097	1	1,097	1,264	0,323750
	грешка	3,469	4	0,867		
48	метода	1,990	1	1,990	2,855	0,166334
	грешка	2,787	4	0,697		
60	метода	2,875	1	2,875	2,967	0,160107
	грешка	3,876	4	0,969		
72	метода	1,338	1	1,338	1,608	0,273619
	грешка	3,329	4	0,832		
84	метода	0,985	1	0,985	2,028	0,227745
	грешка	1,945	4	0,486		
96	метода	1,959	1	1,959	2,865	0,165793
	грешка	2,735	4	0,684		

Табела 8.7. Једнофакторијална анализа варијансе садржаја шећера током биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава чија су основа отпадне воде из производње розе вина

t (h)	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
0	метода	3,339	1	3,339	3,718	0,126057
	грешка	3,592	4	0,898		
6	метода	0,786	1	0,786	0,914	0,393270
	грешка	3,439	4	0,860		
12	метода	0,874	1	0,874	1,003	0,373323
	грешка	3,487	4	0,872		
18	метода	0,227	1	0,227	0,248	0,644333
	грешка	3,654	4	0,914		
24	метода	0,700	1	0,700	0,757	0,433370
	грешка	3,701	4	0,925		
30	метода	0,375	1	0,375	0,525	0,508694
	грешка	2,855	4	0,714		
36	метода	0,002	1	0,002	0,002	0,967742
	грешка	3,601	4	0,900		
42	метода	0,220	1	0,220	0,287	0,620359
	грешка	3,069	4	0,767		
48	метода	0,167	1	0,167	0,325	0,599288
	грешка	2,053	4	0,513		
60	метода	0,360	1	0,360	0,333	0,594771
	грешка	4,325	4	1,081		
72	метода	0,004	1	0,004	0,005	0,947267
	грешка	3,445	4	0,861		
84	метода	0,360	1	0,360	0,369	0,576536
	грешка	3,908	4	0,977		
96	метода	1,733	1	1,733	2,531	0,186866
	грешка	2,740	4	0,685		

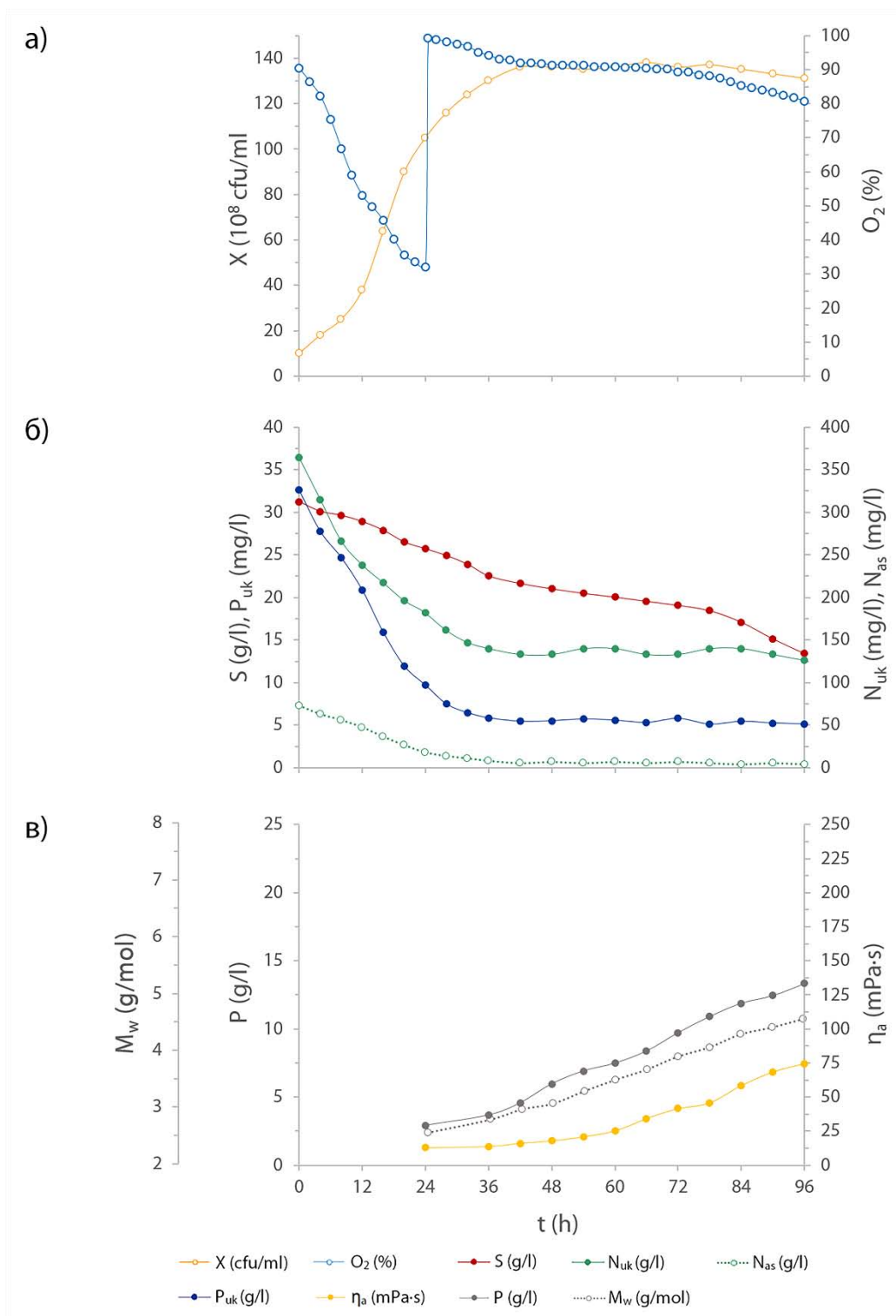
Табела 8.8. Реолошке карактеристике медијума формулисаног састава током биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору

t (h)	бело вино		розе вино	
	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	K (Pa·s <sup>n</sup> )
36	0,5453	0,1467	0,5278	0,1026
48	0,4750	0,3144	0,4325	0,3901
60	0,3774	0,9079	0,4066	0,5874
72	0,3475	1,5660	0,3903	0,8526
84	0,3172	3,0289	0,3775	1,1525
96	0,3012	3,9227	0,3593	1,4186

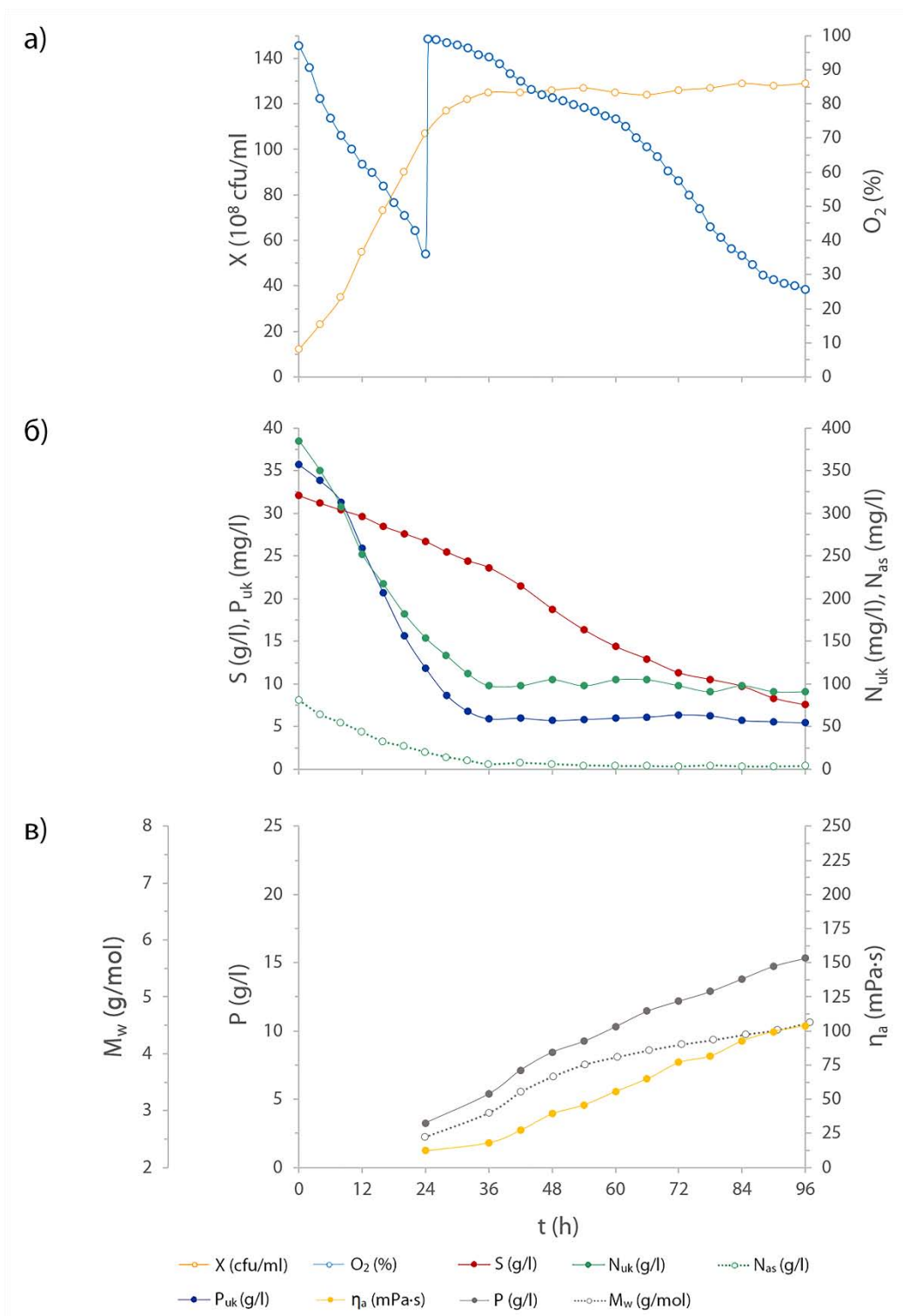
Табела 8.9. Једнофакторијална анализа варијансе показатеља успешности биосинтезе ксантана у лабораторијском биореактору на медијумима формулисаног састава

Параметар	Извор варијабилитета	SS	DF	MS	F-вредност	p-вредност
P (g/l)	отпадна вода	52,570	1	52,570	131,985	0,000328
	грешка	1,593	4	0,398		
S (g/l)	отпадна вода	2,140	1	2,140	4,812	0,093321
	грешка	1,779	4	0,445		
M <sub>w</sub> (10 <sup>5</sup> g/mol)	отпадна вода	0,640	1	0,640	73,877	0,001007
	грешка	0,035	4	0,009		
η <sub>a</sub> <sup>p</sup> (mPa·s)	отпадна вода	60,865	1	60,865	13,539	0,021212
	грешка	17,982	4	4,495		

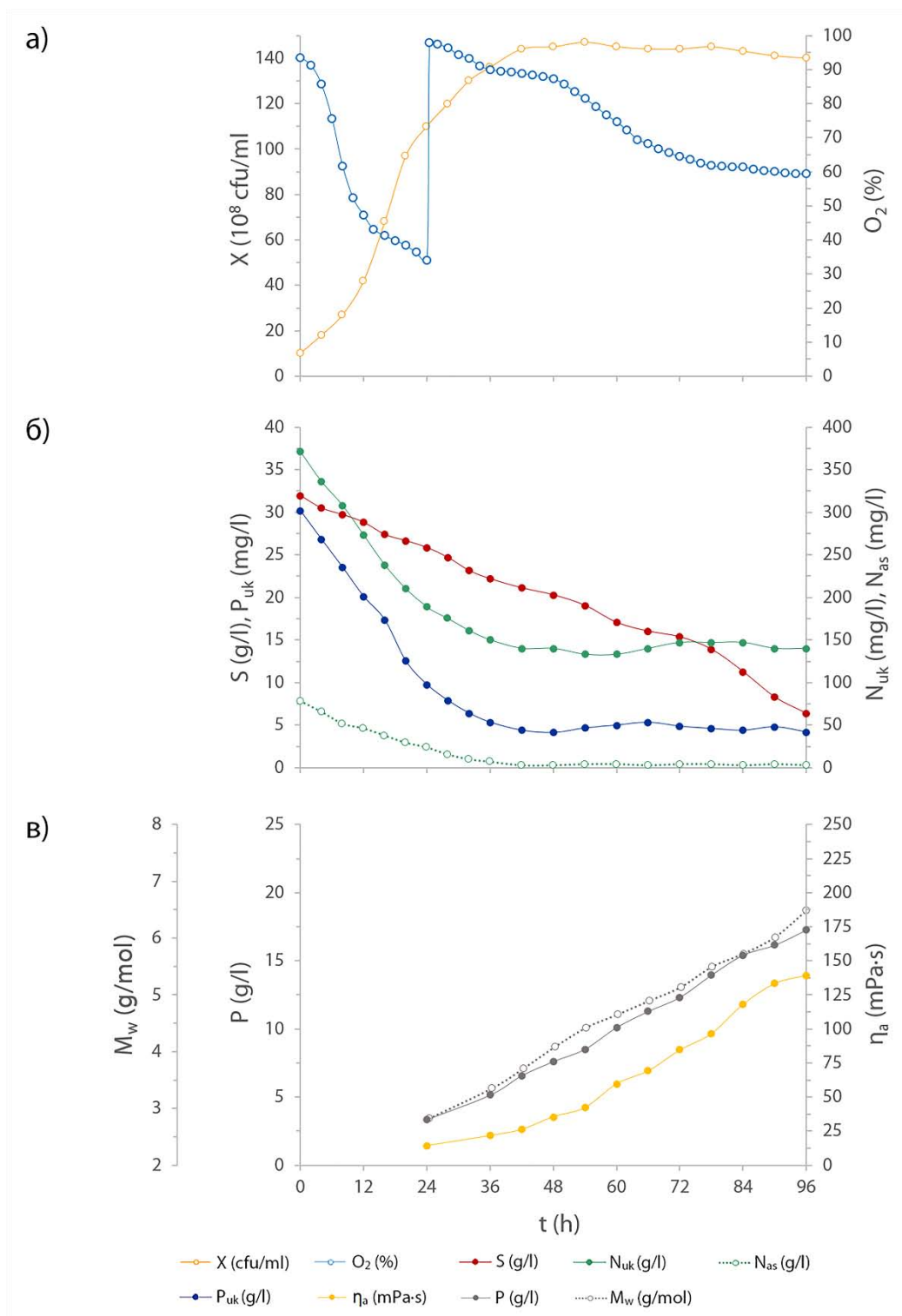
## 8.2. Прилог 2



Слика 8.1. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 1,00 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 1)

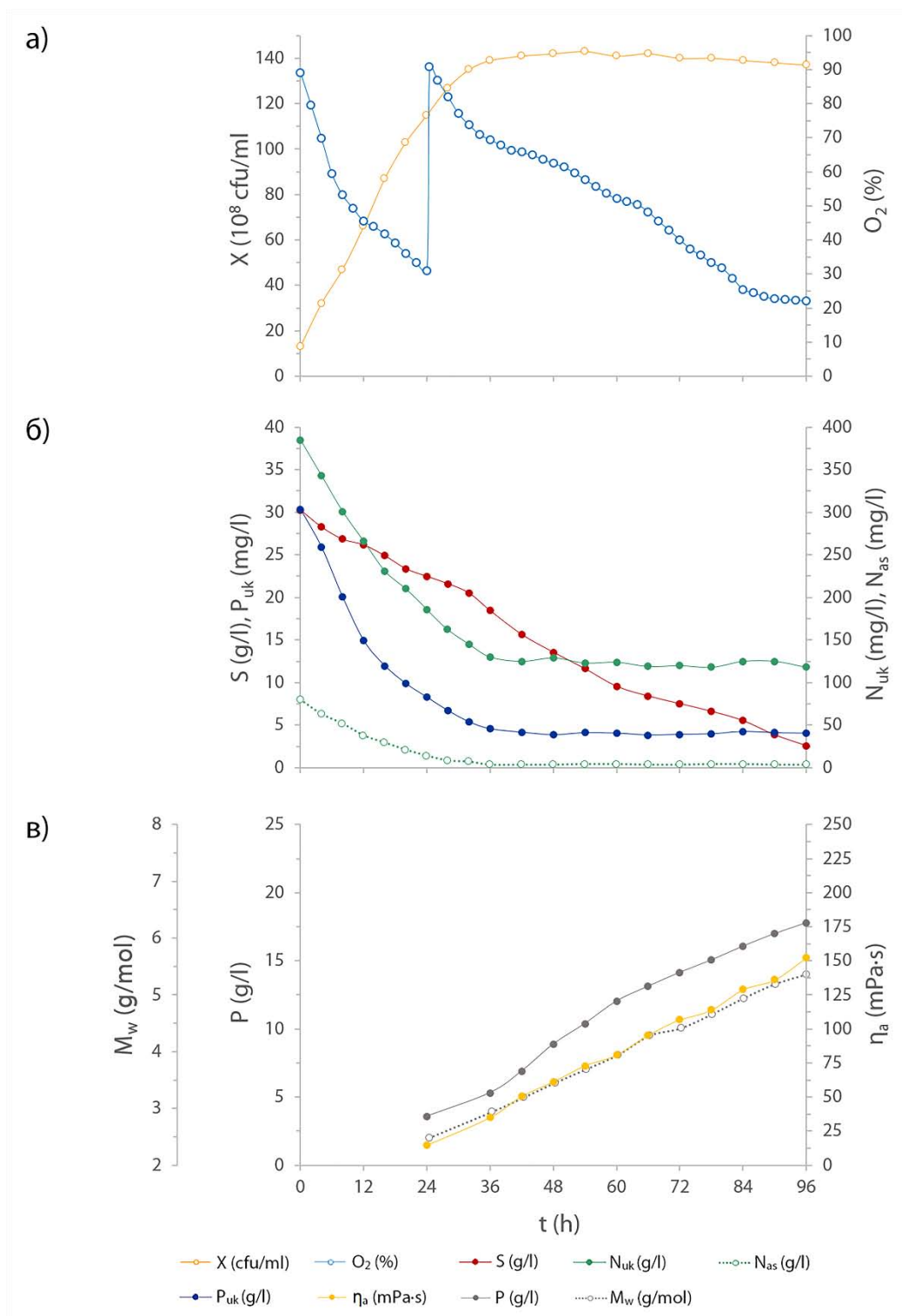


Слика 8.2. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 1,00 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 2)

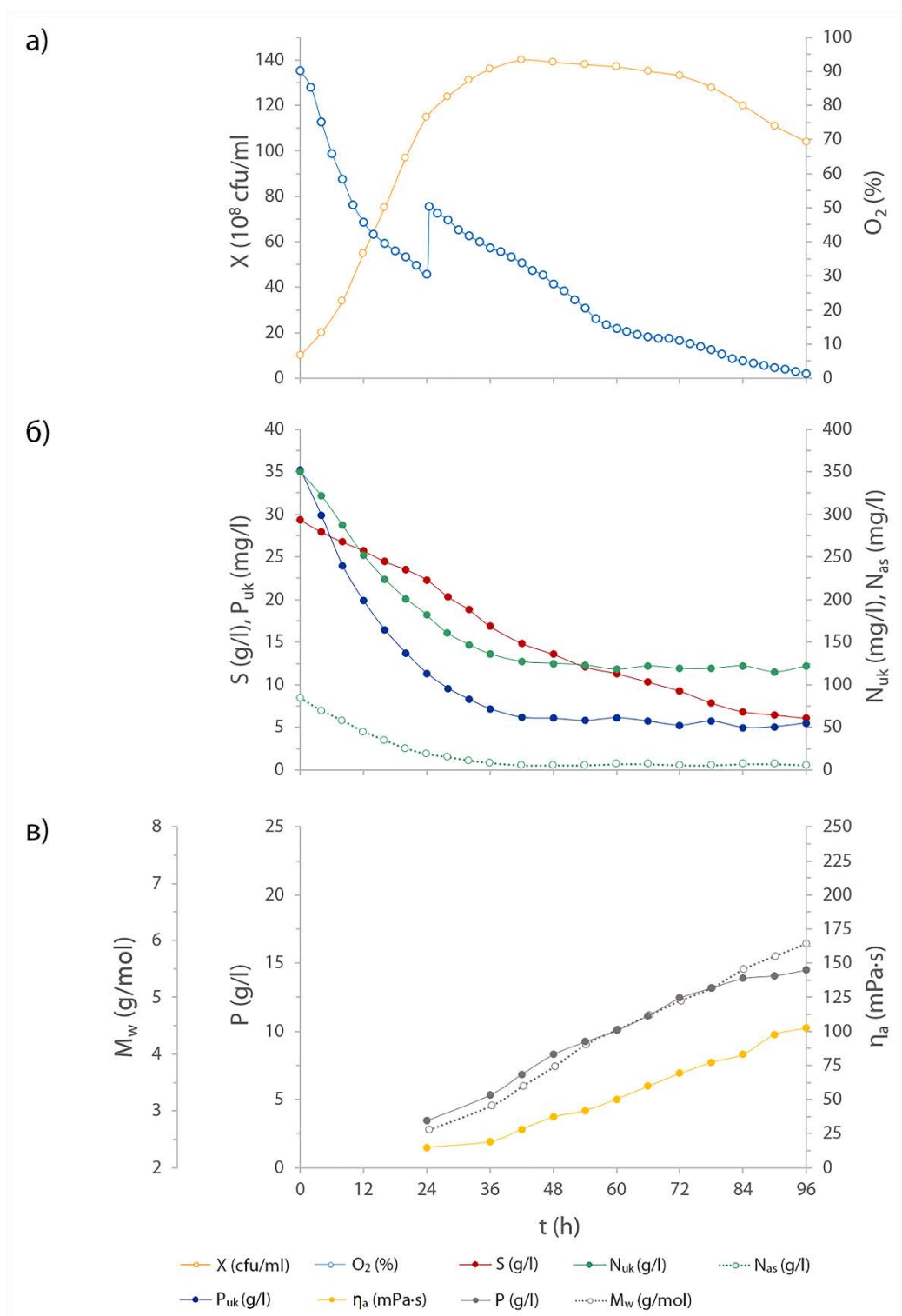


Слика 8.3. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 2,50 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 3)

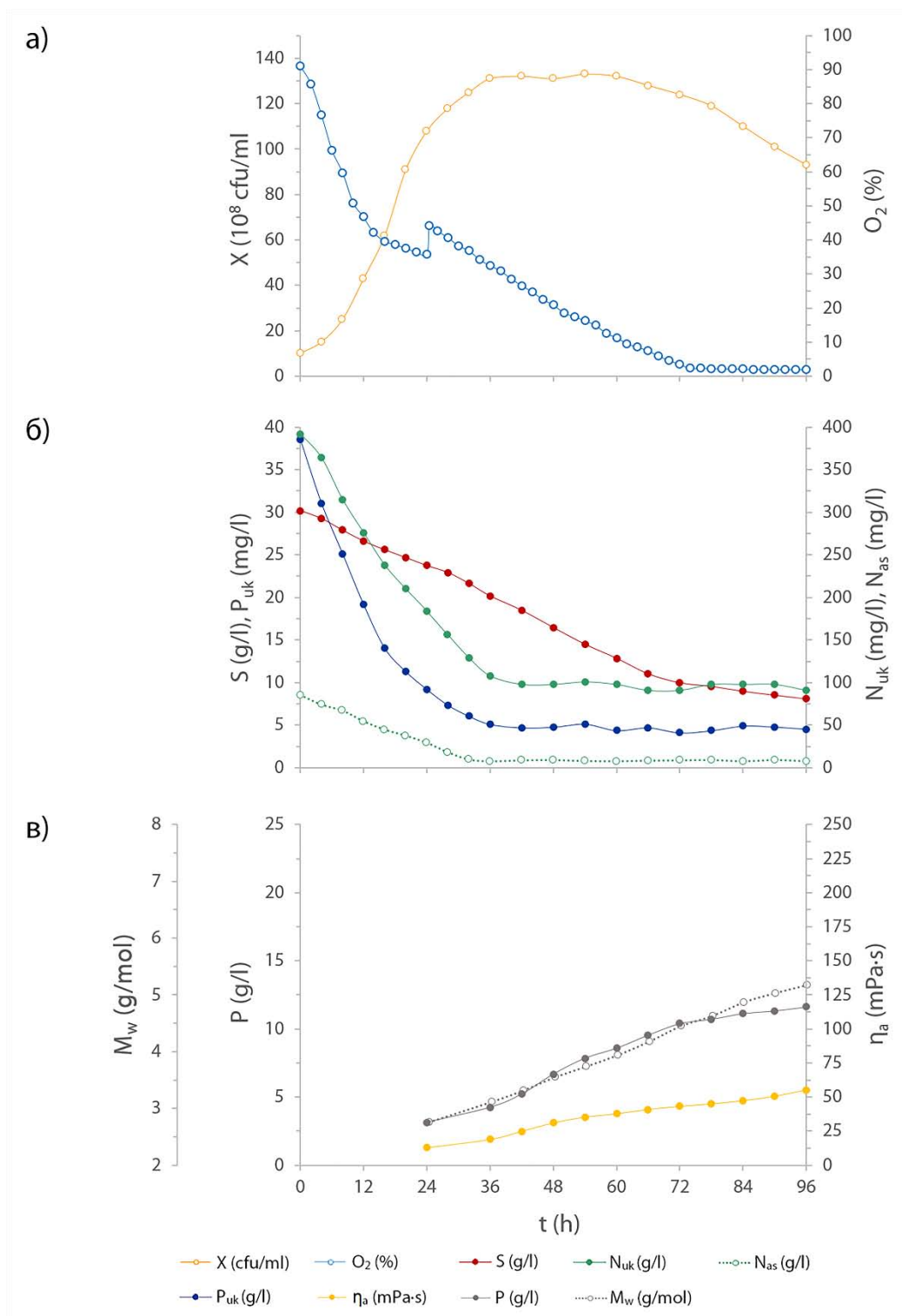




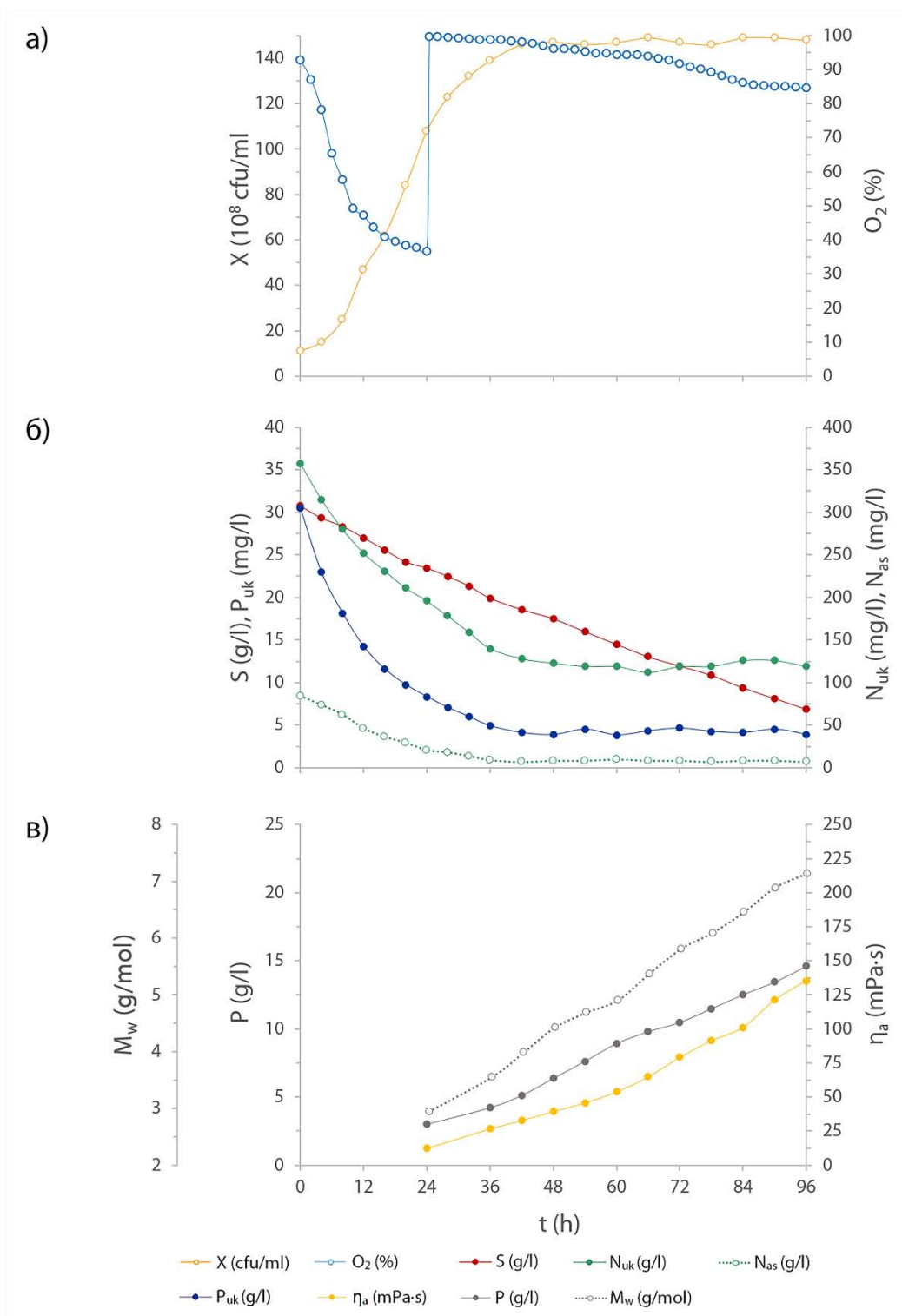
Слика 8.4. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 2,50 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 4)



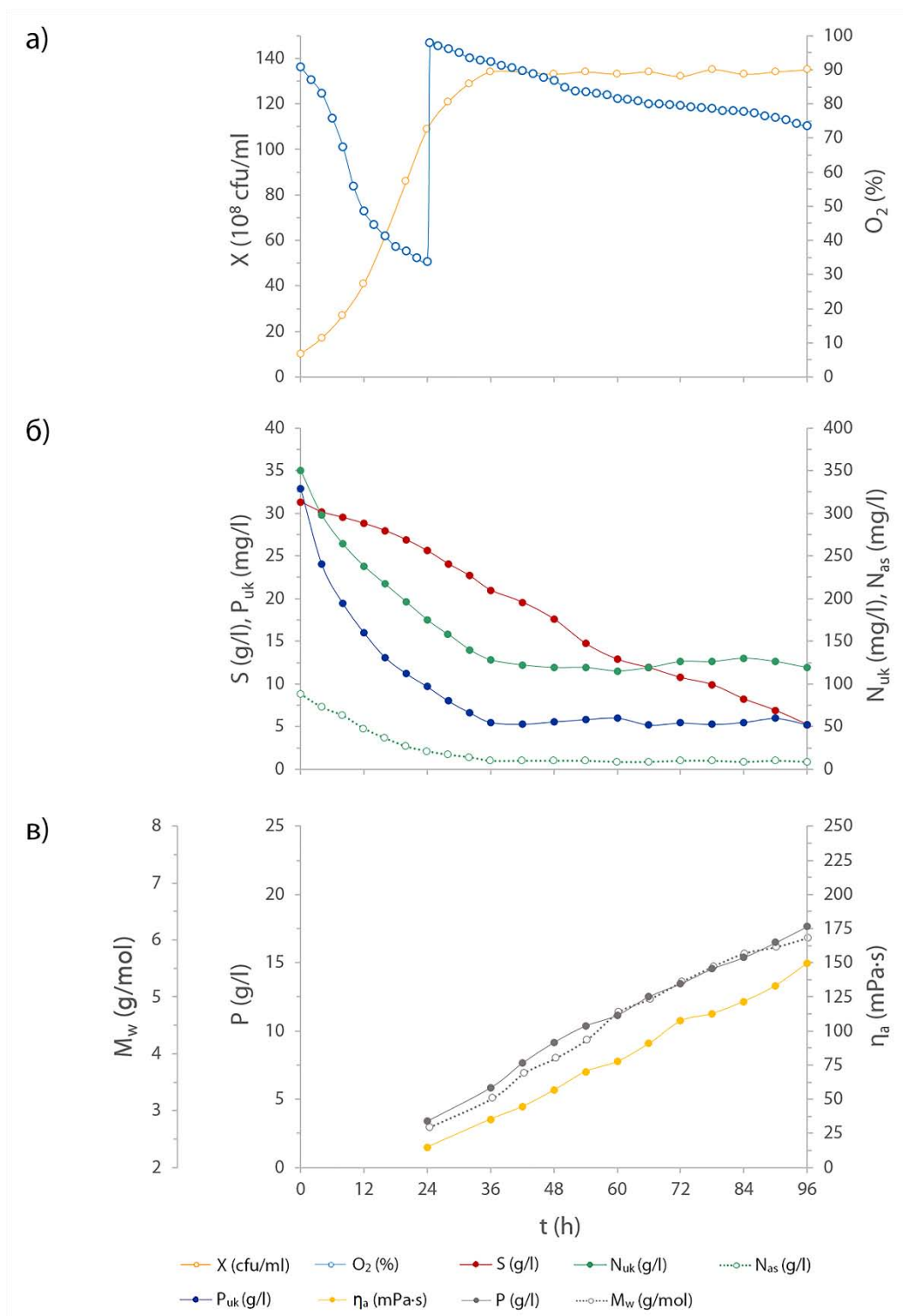
Слика 8.5. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min (оглед 5)



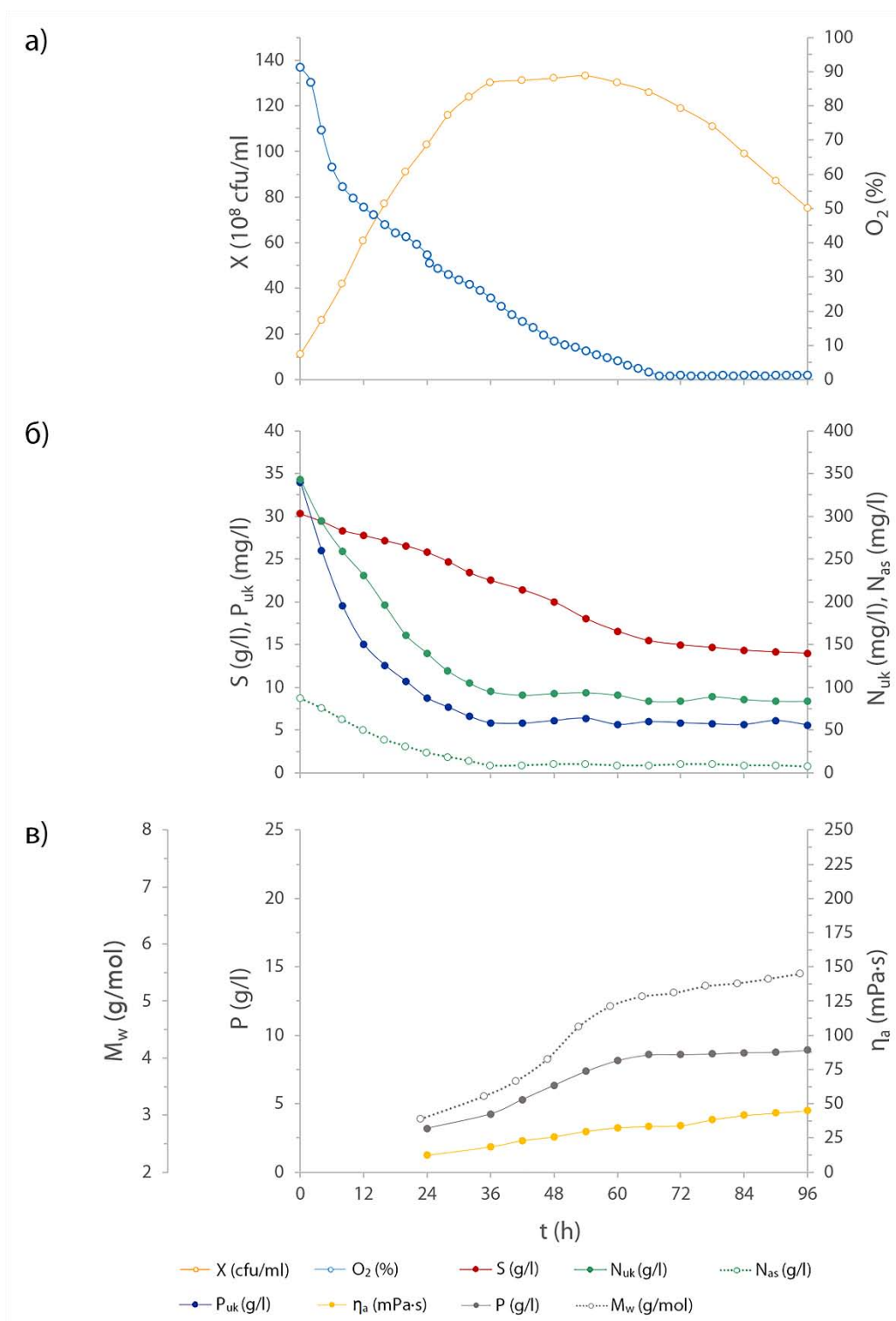
Слика 8.6. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 200 о/min (оглед 6)



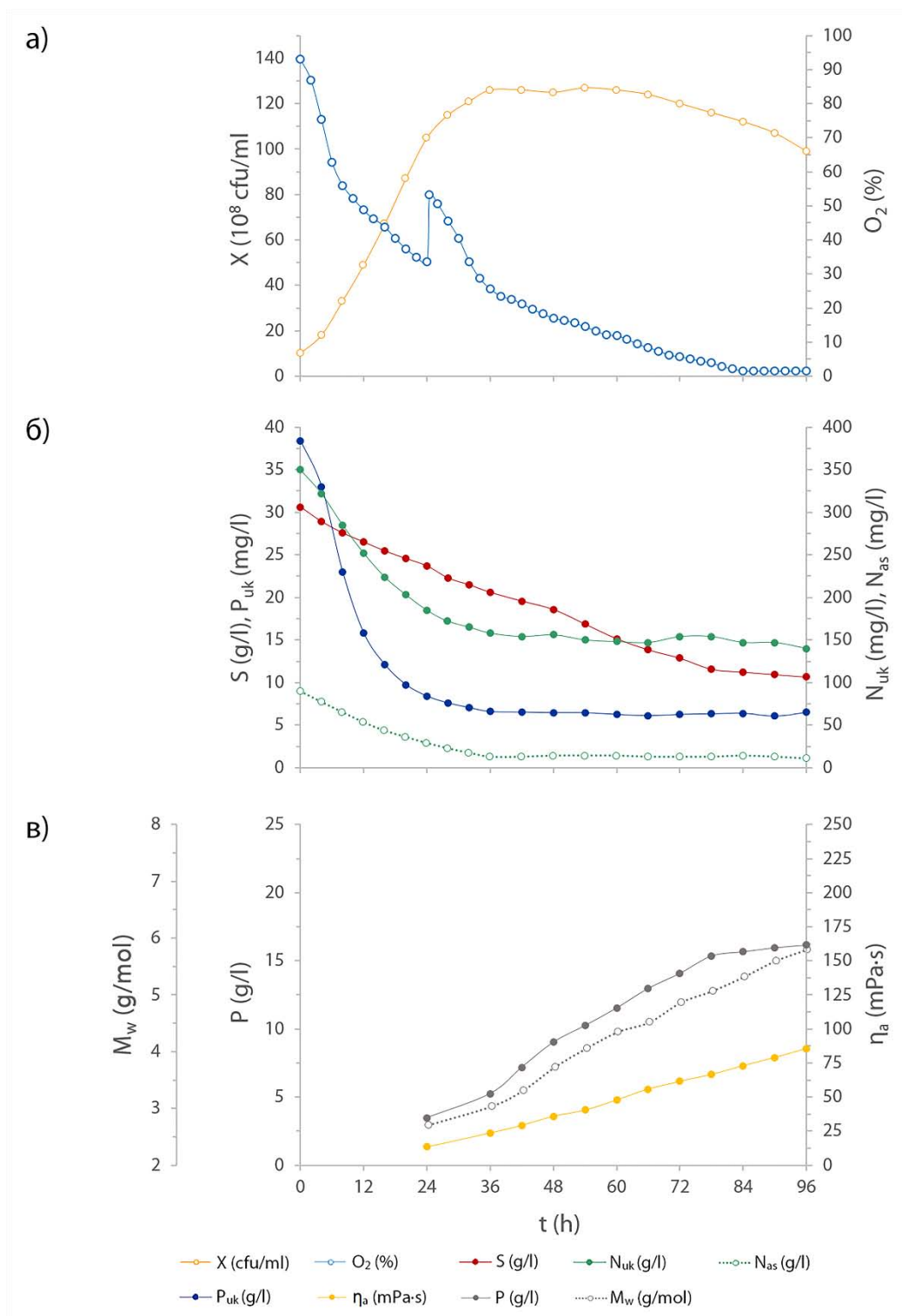
Слика 8.7. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 25°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 800 o/min (оглед 7)



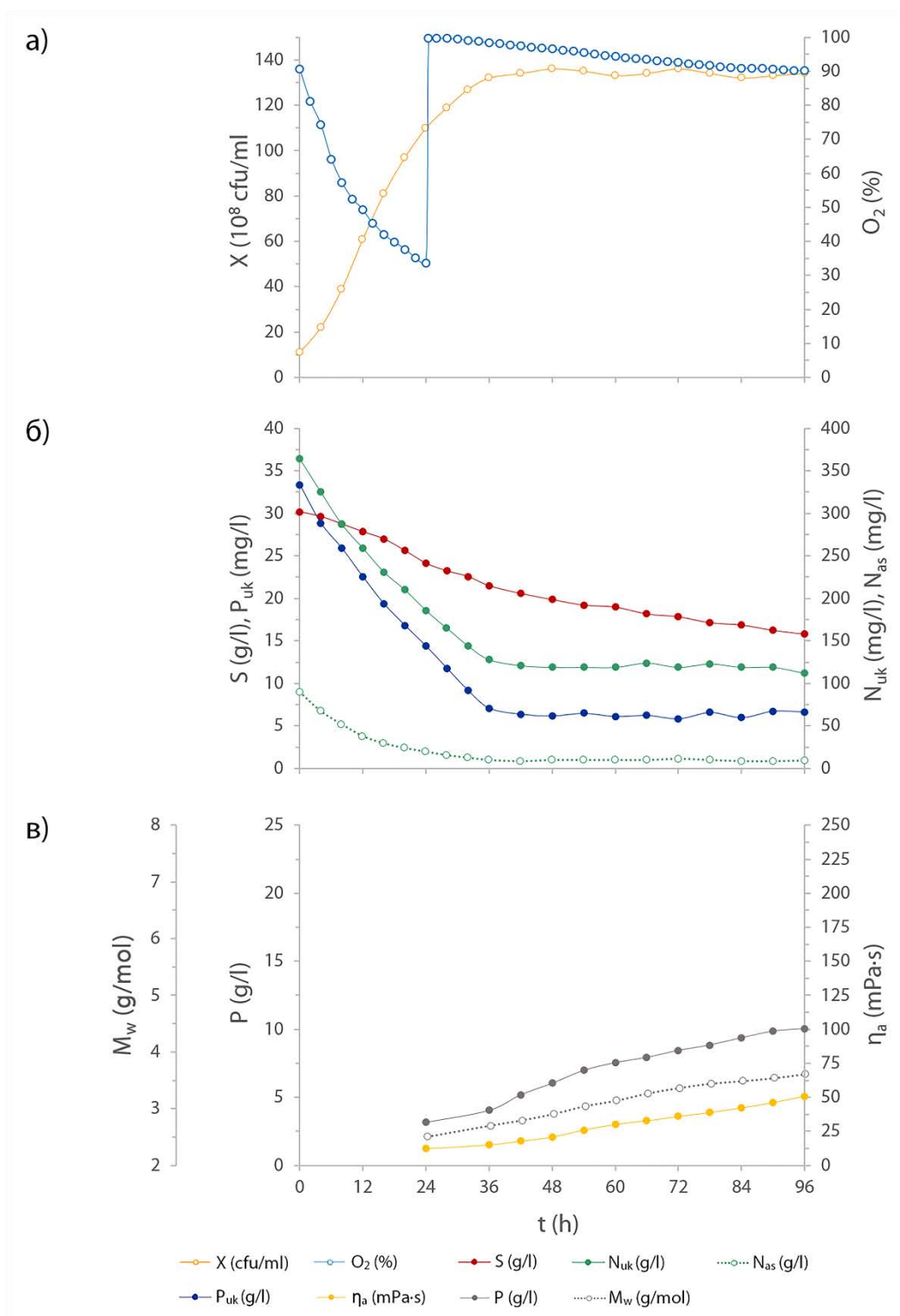
Слика 8.8. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 35°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 800 o/min (оглед 8)



Слика 8.9. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,00 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min (оглед 9)

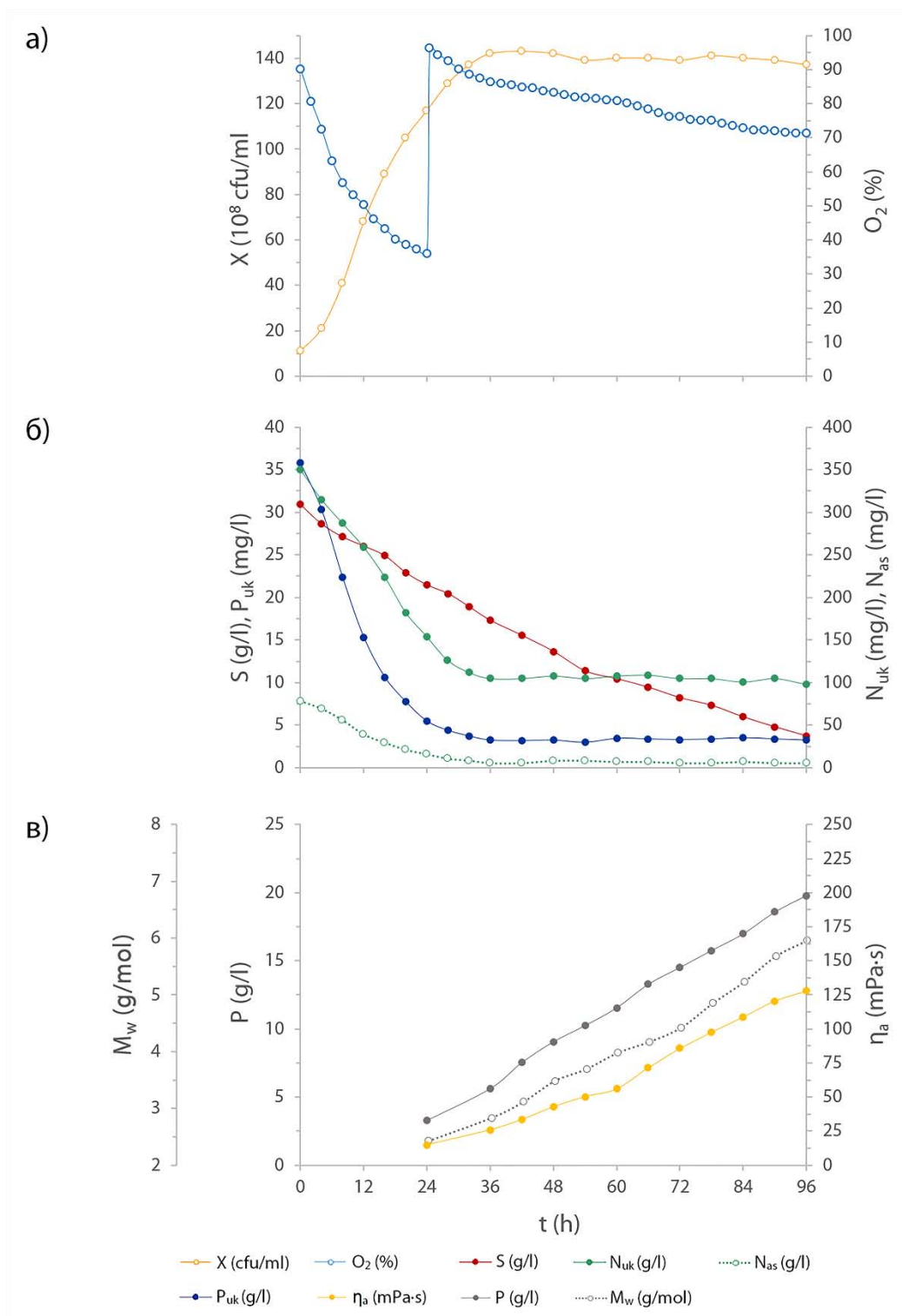


Слика 8.10. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 2,50 l/l/min и брзини мешања од 200 o/min (оглед 10)

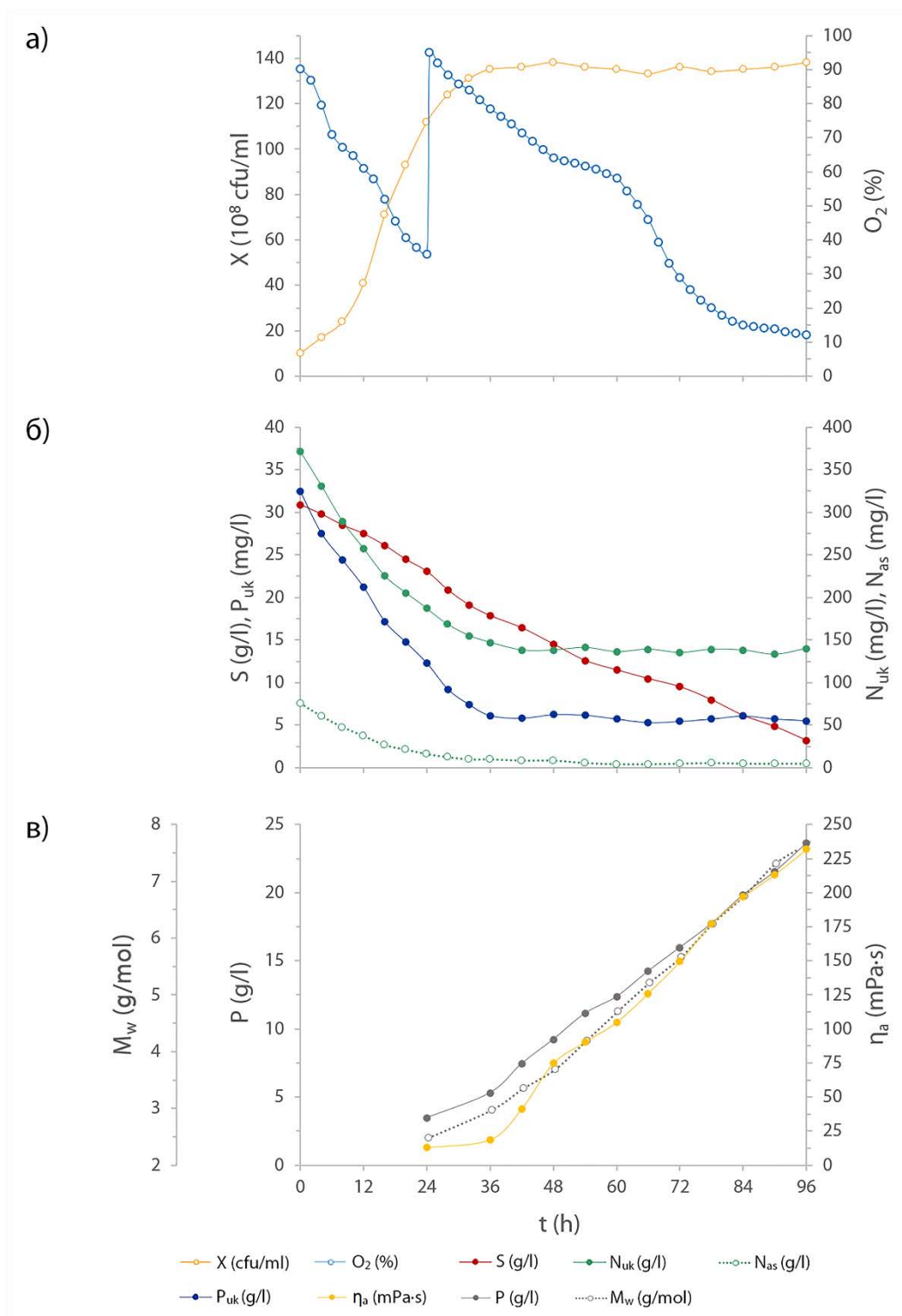


Слика 8.11. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од  $30^\circ\text{C}$ , интензитету аерације од  $1,00 \text{ l/l/min}$  и брзини мешања од  $800 \text{ o/min}$  (оглед 11)

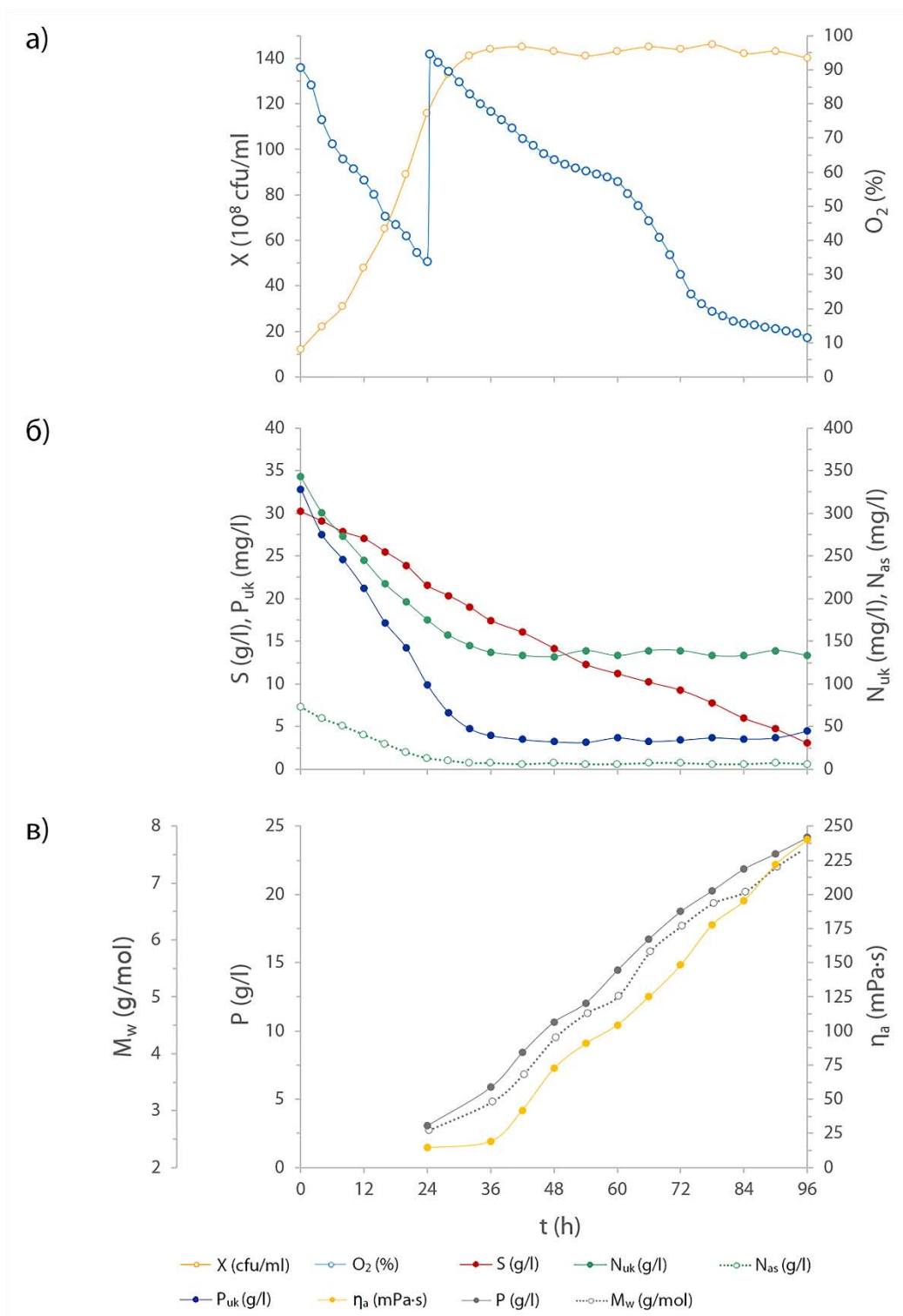




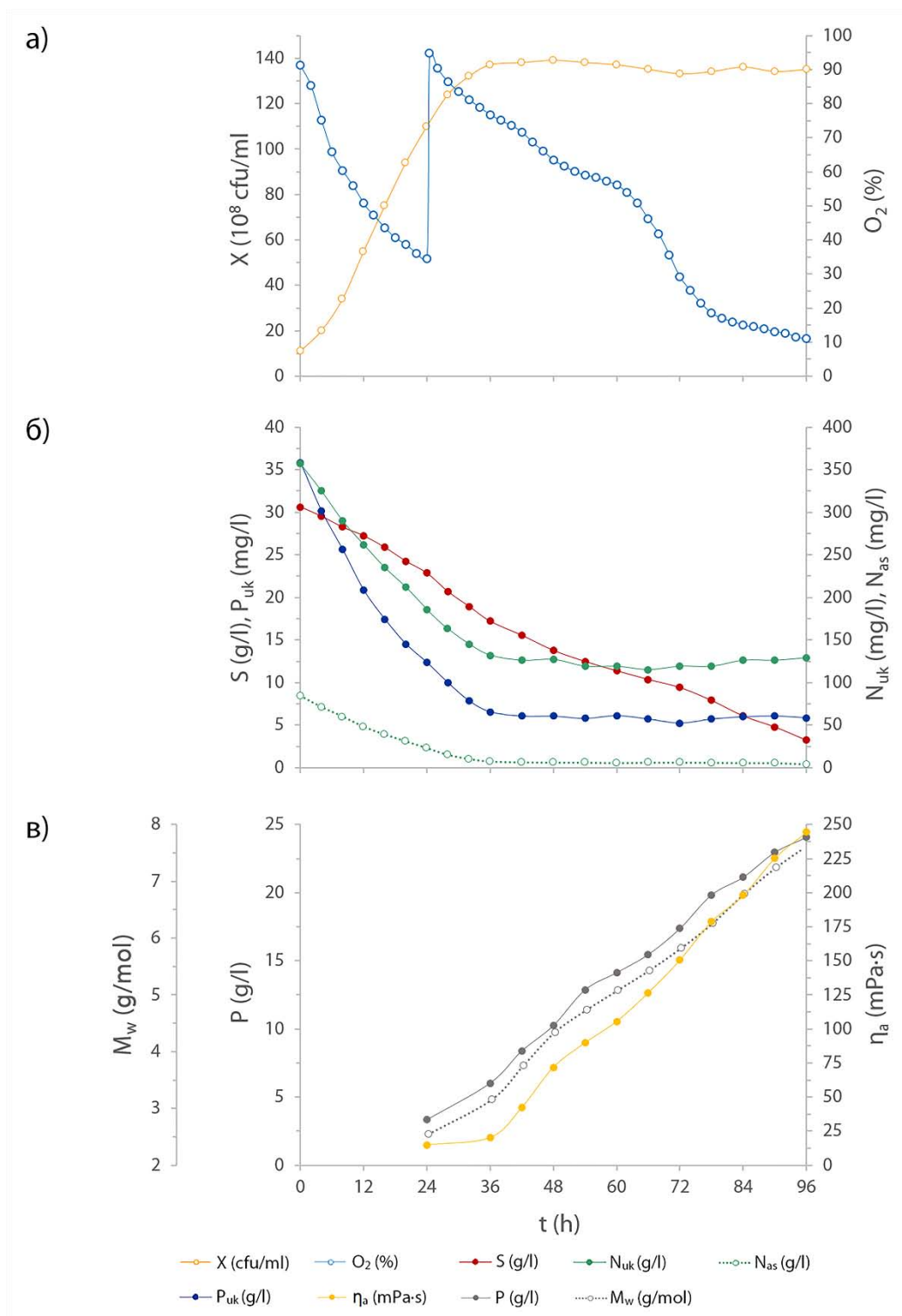
Слика 8.12. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од  $30^\circ\text{C}$ , интензитету аерације од  $2,50$  l/l/min и брзини мешања од  $800$  o/min (оглед 12)



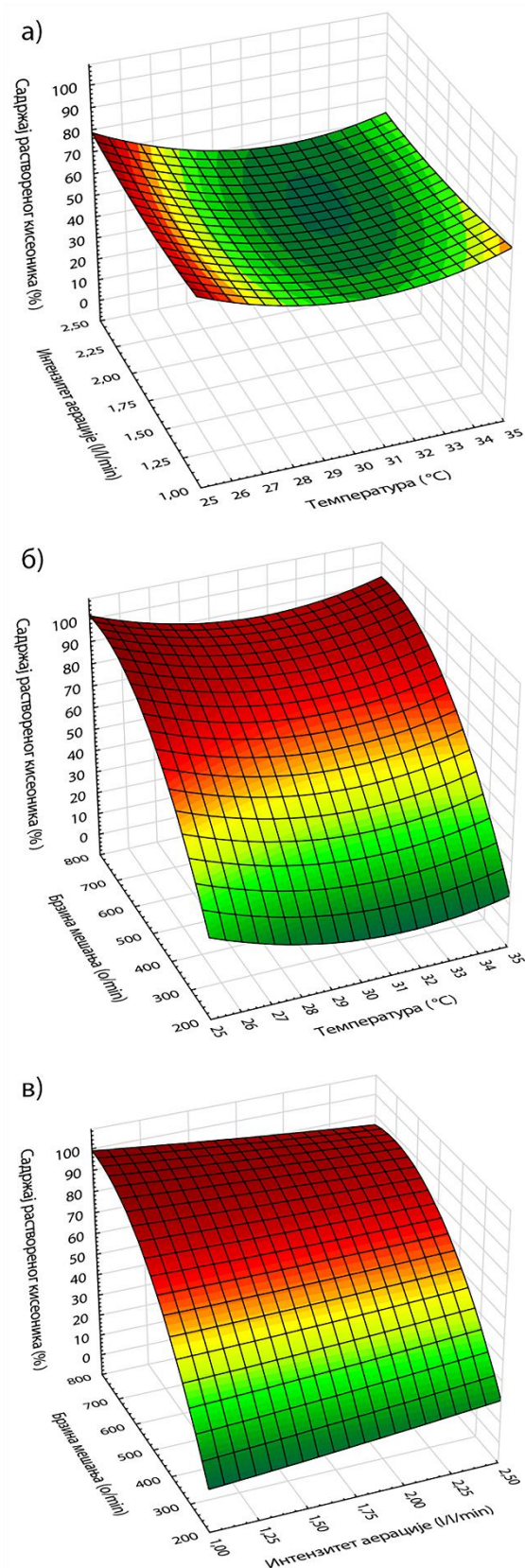
Слика 8.13. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 13)



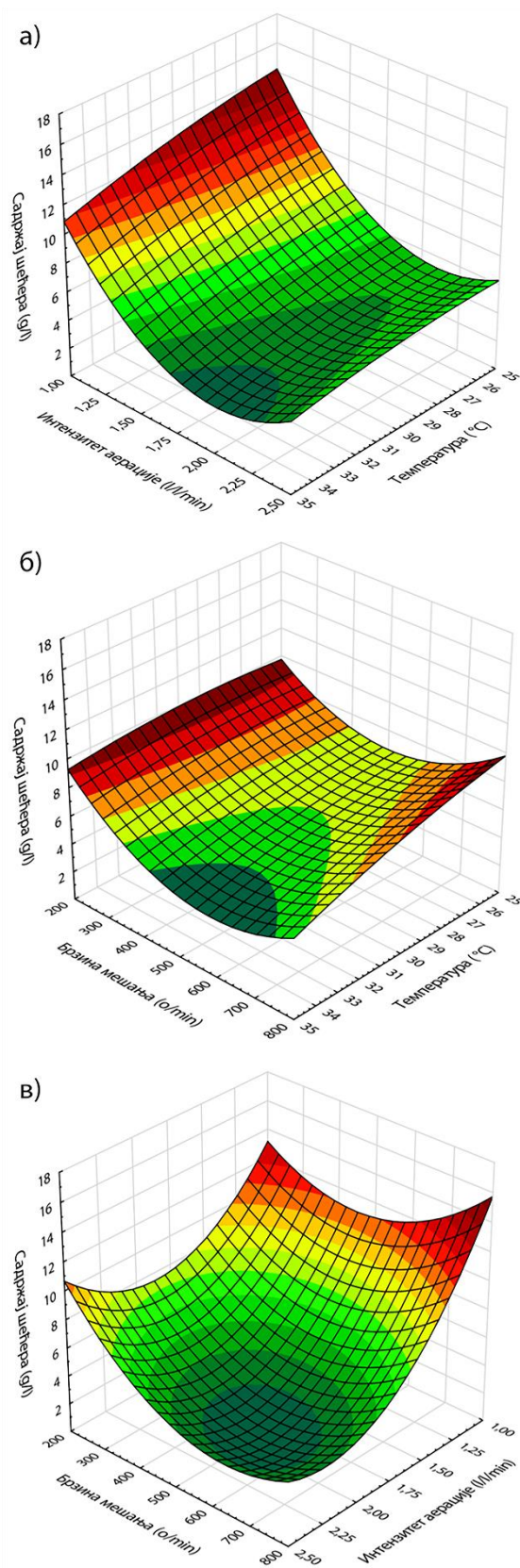
Слика 8.14. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 14)



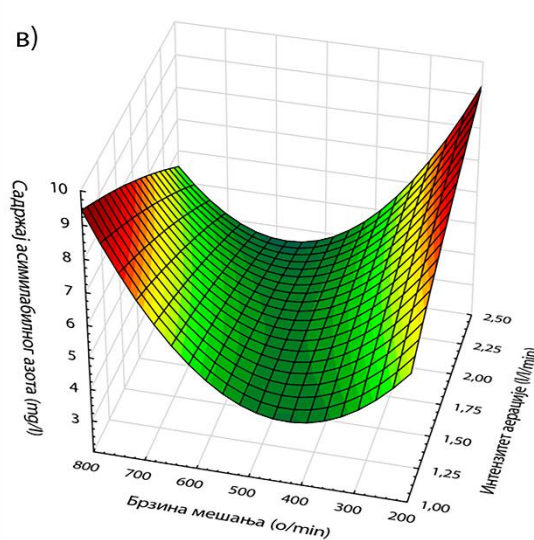
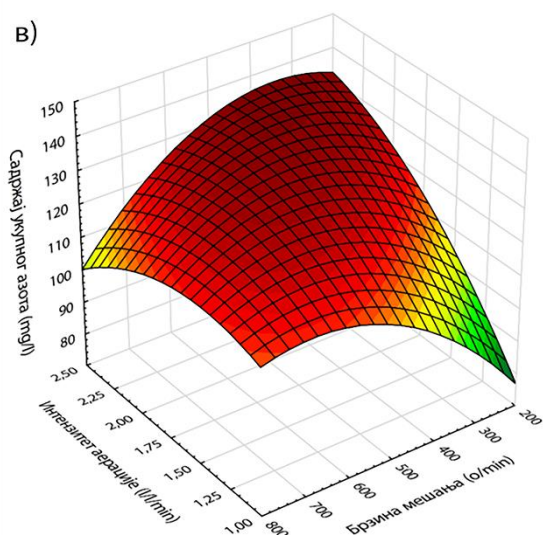
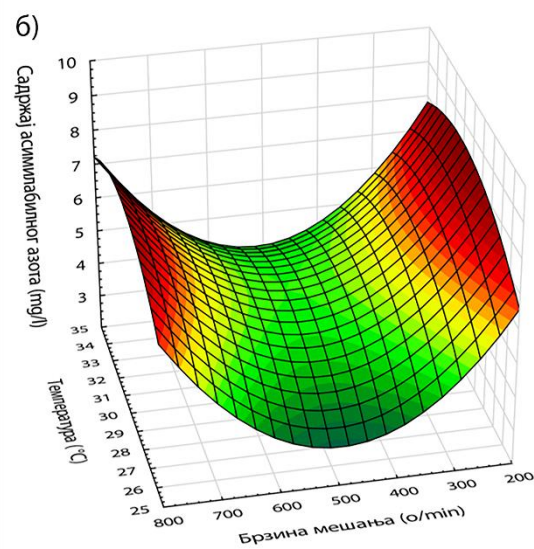
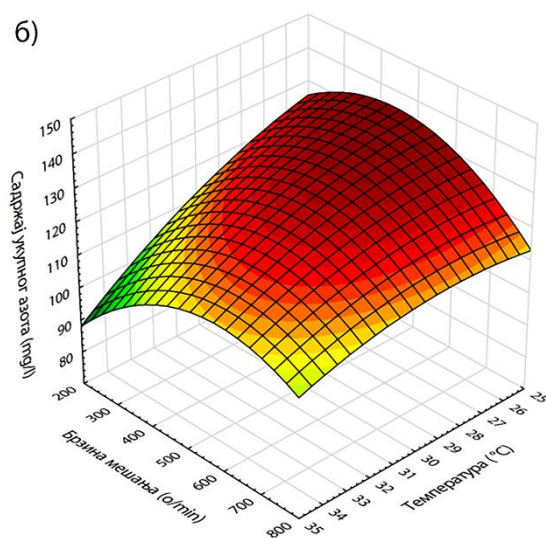
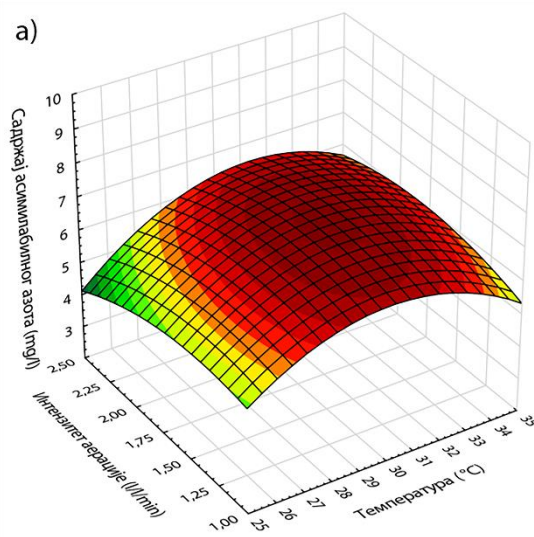
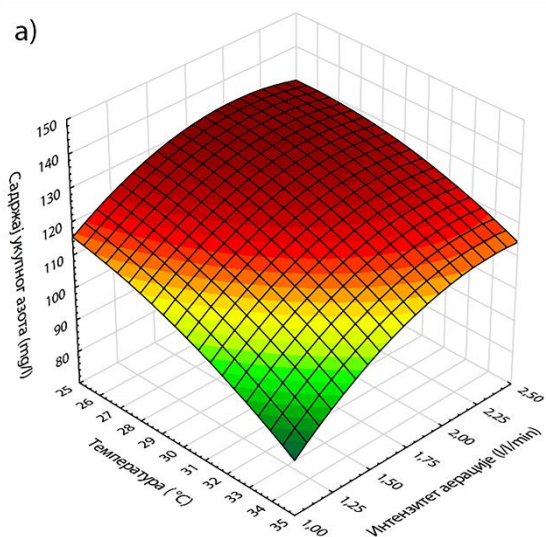
Слика 8.15. Ток биосинтезе ксантана на медијуму формулисаног састава при температури од 30°C, интензитету аерације од 1,75 l/l/min и брзини мешања од 500 o/min (оглед 15)



Слика 8.16. Садржај раствореног кисеоника у медијуму вискозитета 35 mPa·s у функцији два фактора при константној вредности трећег:  
 а) брзина мешања (500 o/min),  
 б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),  
 в) температура (30°C)

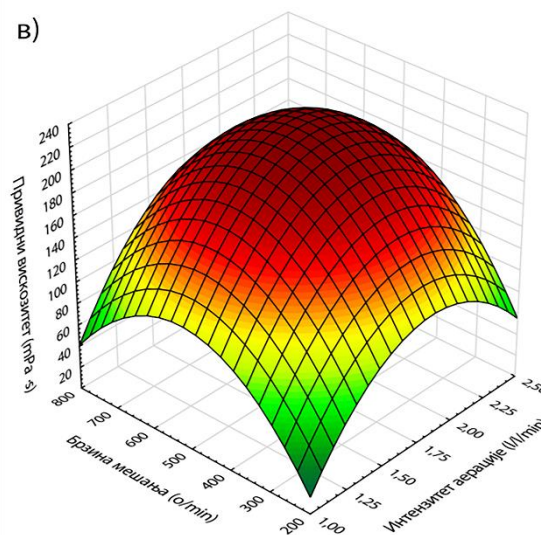
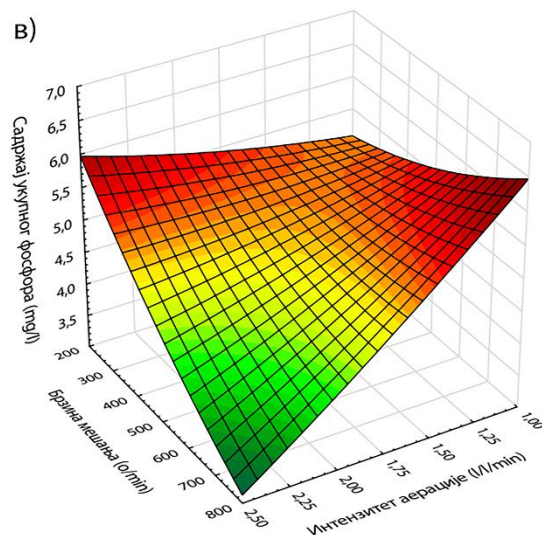
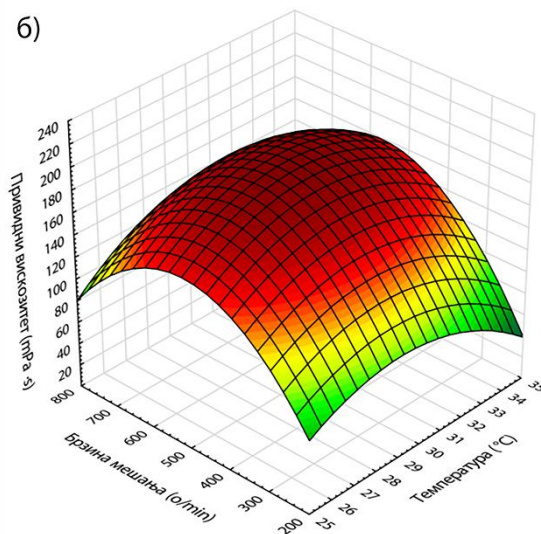
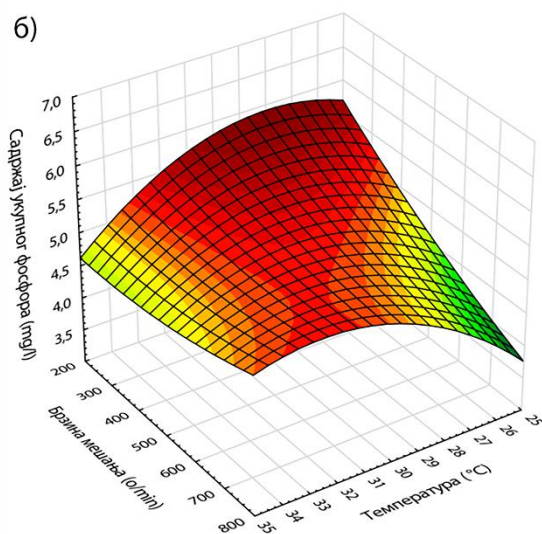
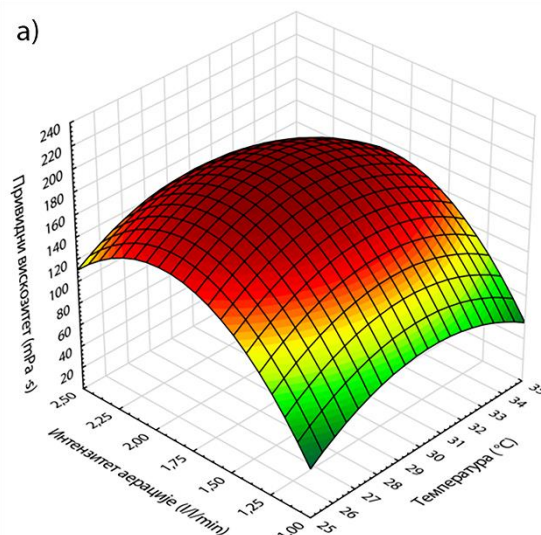
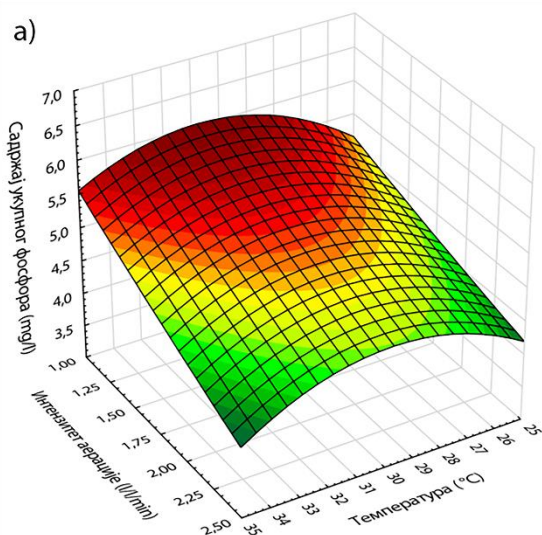


Слика 8.17. Садржај шећера у функцији два фактора при константној вредности трећег:  
 а) брзина мешања (500 o/min),  
 б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),  
 в) температура (30°C)



Слика 8.18. Садржај укупног азота у функцији два фактора при константној вредности трећег:  
 а) брзина мешања (500 о/min),  
 б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),  
 в) температура (30°C)

Слика 8.19. Садржај асимилабилног азота у функцији два фактора при константној вредности трећег:  
 а) брзина мешања (500 о/min),  
 б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),  
 в) температура (30°C)



Слика 8.20. Садржај укупног фосфора у функцији два фактора при константној вредности трећег:

- а) брзина мешања (500 о/min),
- б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),
- в) температура (30°C)

Слика 8.21. Вискозитет медијума у функцији два фактора при константној вредности трећег:

- а) брзина мешања (500 о/min),
- б) интензитет аерације (1,75 l/l/min),
- в) температура (30°C)

# КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

---



<b>Редни број:</b> РБР	
<b>Идентификациони број</b> ИБР	
<b>Тип документације:</b> ТД	монографска документација
<b>Тип записа:</b> ТЗ	текстуални штампани материјал
<b>Врста рада:</b> ВР	докторска дисертација
<b>Име и презиме аутора:</b> АУ	Зорана З. Рончевић
<b>Ментор:</b> МН	Др Јелена Додић, ванредни професор, Технолошки факултет Нови Сад
<b>Наслов рада:</b> НР	Оптимизација производње ксантана у лабораторијском биореактору на отпадним водама винарија
<b>Језик публикације:</b> ЈП	српски (ћирилица)
<b>Језик извода:</b> ЈИ	српски/енглески
<b>Земља публикавања:</b> ЗП	Србија
<b>Уже географско подручје:</b> УГП	Војводина
<b>Година:</b> ГО	2016
<b>Издавач:</b> ИЗ	ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> МА	Нови Сад, Булевар цара Лазара 1
<b>Физички опис рада:</b> ФО	број поглавља 8; страна 164; табела 45; слика 39; једначина 10; литературних навода 144
<b>Научна област:</b> НО	Технолошко инжењерство
<b>Научна дисциплина:</b> НД	Биотехнологија
<b>Предметна одредница, кључне речи:</b> ПО	биотехнолошка производња, отпадне воде винарија, ксантан, моделовање, оптимизација
<b>УДК</b>	577.114:628.3.03.034.2:66.011(043.3)
<b>Чува се у:</b> ЧУ	Библиотека Технолошког факултета Нови Сад, 21000 Нови Сад, Булевар цара Лазара 1
<b>Важна напомена:</b> ВН	нема

**Извод:  
ИЗ**

Потражња за ксантаном, од момента његовог открића шездесетих година двадесетог века, константно се повећава због његове широке употребне вредности у различитим гранама индустрије, а процењује се да ће тржишна вредност овог значајног биополимера у 2020. години износити 987,7 милиона америчких долара. Биотехнолошка производња ксантана, микробиолошког секундарног метаболита, је карактеристична по неспецифичности угљенохидратног супстрата, минималним потребама за нутријентима и огромним захтевима за процесном водом. Стандарди квалитета процесне воде су специфични и условљени примењеним биокатализаторима. Како квалитет ове воде одговара квалитету воде за пиће, ограниченост водних ресурса и трошкови припреме воде захтеваног квалитета намећу потребу за проналажењем алтернативних супстрата. Све наведено указује да се за биосинтезу овог тржишно вредног биопроизвода могу употребити отпадне воде које генерише индустрија вина. С обзиром да је производња ксантана веома захтевна и у погледу регулације процесних параметара одговорних за растворљивост кисеоника велики напори непрестано се улажу у унапређење овог сегмента биопроцеса.

Основни циљ ове докторске дисертације је оптимизација производње ксантана у лабораторијском биореактору одговарајућих геометријских односа запремине 7 l, метаболичком активношћу референтног соја *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 на култивационом медијуму оптималне формулације чија су основа отпадне воде винарија, у погледу процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника.

У оквиру истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом оптимизација вредности процесних параметара значајних за садржај раствореног кисеоника изведена је применом методе жељене функције у комбинацији са дефинисаним математичким моделима. Као услови задати су максимална продукција ксантана којег карактерише максимална молекулска маса, али и максималан вискозитет раствора. Дефинисане оптималне вредности испитиваних фактора, при којима жељена функција има највећу вредност (0,969), су температура од 29,33°C, интензитет аерације од 1,95 l/l/min и брзина мешања од 475,54 o/min, док су моделом предвиђене вредности показатеља тока, као и показатеља успешности биосинтезе ксантана следеће: садржај биомасе од  $137,34 \cdot 10^8$  cfu/ml, садржај раствореног кисеоника од 10,15%, садржај шећера од 2,84 g/l, садржај укупног азота од 137,56 mg/l, садржај асимилабилног азота од 4,78 mg/l, садржај укупног фосфора од 5,18 mg/l, вискозитет култивационе течности од 237,92 mPa·s, садржај ксантана од 24,18 g/l, молекулска маса ксантана од  $7,73 \cdot 10^5$  g/mol и вискозитет раствора ксантана од 60,48 mPa·s. На основу резултата оптимизације изведена је производна фаза биопроцеса на температури од 29°C, при интензитету аерације од 2 l/l/min и брзини мешања од 475 o/min при чему је добијен садржај ксантана, одговарајућег квалитета, од 23,85 g/l и остварен степен конверзије извора угљеника у производ од 79,17%, док садржај раствореног кисеоника није опао испод критичне вредности.

Са технолошког аспекта, резултати ових истраживања представљају поуздан извор информација за увећање размера предложеног биопроцеса и пројектовање биореактора одговарајућих карактеристика.

**Датум прихватања теме  
од стране Сената:  
ДП**

12.07.2016. године

**Датум одбране:  
ДО**

**Чланови комисије:  
КО**

Председник: Др Јована Граховац, доцент, Технолошки факултет Нови Сад

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

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

**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:** Zorana Z. Rončević  
AU

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

**Title:** Optimization of xanthan production in laboratory bioreactor on winery 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 8; pages 164; tables 45; figures 39; equations 10; refernces 144  
PD

**Scientific field:** Technological engineering  
SF

**Scientific discipline :** Biotehnology  
SD

**Subject, Key words:** biotechnological production, winery wastewaters, xanthan, modeling, optimization  
SKW

UC 577.114:628.3.03.034.2:66.011(043.3)

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

**Note:** none  
N

**Abstract:****AB**

Demand for xanthan has been increasing since its discovery in the 1960s due to its wide application in various branches of industry, and it is estimated that market value of this important biopolymer will rise up to 987.7 million US dollars by 2020. Biotechnological production of xanthan, a secondary microbial metabolite, is characterized by its non-specific carbon substrate, minimal nutrient and large process water requirements. Process water quality standards are specific and conditioned by the used biocatalysts. Since the quality of this water matches the quality of drinking water, limited water resources and costs of preparing water of the required quality result in the need for alternative substrates. The aforementioned suggests that winery wastewaters could be used for the biosynthesis of this valuable bioproduct. Since xanthan production is very complicated regarding regulation of process parameters responsible for oxygen solubility, great efforts are investing in the improvement of this particular bioprocess segment.

The main goal of this PhD thesis is to optimize xanthan production in a 7 L laboratory bioreactor of specific geometric ratio, using the metabolic activity of the *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 reference strain in optimal cultivation media based on winery wastewaters, focusing on process parameters significant for the content of dissolved oxygen.

Within the research of this PhD thesis, optimization of process parameters significant for the content of dissolved oxygen was performed using the desirability function approach combined with defined mathematical models. The set conditions were the maximum production of xanthan characterized by maximum molecular weight as well as maximum solution viscosity. The defined optimal values for which the desirability function has the highest value (0.969) were temperature of 29.33°C, aeration rate of 1.95 vvm and agitation speed of 475.40 rpm, while the model predicted values of the indicators of the course and the success of xanthan biosynthesis were: biomass content of  $137.34 \cdot 10^8$  cfu/mL, dissolved oxygen content of 10.15%, sugar content of 2.84 g/L, total nitrogen content of 137.56 mg/L, assimilable nitrogen content of 4.78 mg/L, total phosphorus content of 5.18 mg/L, cultivation broth viscosity of 237.92 mPa·s, xanthan content of 24.18 g/L, xanthan molecular weight of  $7.73 \cdot 10^5$  g/mol and xanthan solution viscosity of 60.48 mPa·s. Based on optimization results, the production phase of the bioprocess was performed at a temperature of 29°C, aeration rate of 2 vvm and agitation speed of 475 rpm, which resulted in the high quality xanthan content of 23.85 g/L and conversion rate of carbon source into product of 79.17%, while dissolved oxygen content did not decrease below its critical value.

From a technological aspect, the results of this research represent a reliable source of data for scaling up the suggested bioprocess and designing a bioreactor with the required characteristics.

**Accepted on Senate on:** 12<sup>th</sup> July 2016

**AS****Defended:****DE****Thesis Defend Board:****DB**

President: PhD Jovana Grahovac, assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad

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

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