



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET  
NOVI SAD



STUDIJSKI PROGRAM • BIOTEHNOLOGIJA  
NAUČNA OBLAST • TEHNOLOŠKO INŽENJERSTVO

Ivana Mitrović, dipl. inž.

**OPTIMIZACIJA BIOSINTEZE ANTAGONISTA  
SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE PRIMENOM  
*Streptomyces hygrosopicus***

Doktorska disertacija

Novi Sad • 2018

# SADRŽAJ

---

SPISAK OZNAKA, SIMBOLA I SKRAĆENICA .....	i
SPISAK TABELA .....	iii
SPISAK SLIKA .....	vi
1. UVOD .....	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	4
3. PREGLED LITERATURE.....	7
3.1. SKLADIŠNI PATOGENI JABUKE .....	8
3.1.1. SKLADIŠNI PATOGENI RODA <i>Alternaria</i> .....	9
3.1.1.1. PREGLED STANJA UČESTALOSTI RODA <i>Alternaria</i> NA JABUKAMA U SVETU I KOD NAS .....	10
3.1.1.2. SIMPTOMI <i>Alternaria</i> spp. NA PLODOVIMA JABUKE.....	11
3.1.1.3. IDENTIFIKACIJA <i>Alternaria</i> spp. ....	12
3.1.2. SKLADIŠNI PATOGENI RODA <i>Fusarium</i> .....	14
3.1.2.1. PREGLED STANJA UČESTALOSTI RODA <i>Fusarium</i> NA JABUKAMA U SVETU I KOD NAS .....	15
3.1.2.2. SIMPTOMI <i>Fusarium</i> spp. NA PLODOVIMA JABUKE.....	15
3.1.2.3. IDENTIFIKACIJA <i>Fusarium</i> spp. ....	16
3.2. ANTAGONISTI SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	17
3.3. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE.....	19
3.3.1. PROIZVODNI MIKROORGANIZAM .....	22
3.3.1.1. ROD <i>Streptomyces</i> KAO PROIZVODNI MIKROORGANIZAM .....	22
3.3.1.2. ROD <i>Streptomyces</i> KAO PROIZVOĐAČ SEKUNDARNIH METABOLITA .....	24
3.3.2. HRANLJIVE PODLOGE .....	25
3.3.3. PROCESNI USLOVI .....	28
3.3.3.1. TEMPERATURA .....	28
3.3.3.2. VREDNOST pH .....	29
3.3.3.3. OSMOTSKI PRITISAK.....	29
3.3.3.4. STERILNOST .....	29
3.3.3.5. SADRŽAJ RASTVORENOG KISEONIKA.....	30
3.3.3.6. MEŠANJE.....	31
3.4. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA BIOPROCESA .....	33
3.4.1. POSTUPAK ODZIVNE POVRŠINE .....	34
3.4.2. METODA ŽELJENE FUNKCIJE .....	35

<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>36</b>
4.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE.....	37
4.1.1. IZOLACIJA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	37
4.1.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA <i>Alternaria</i> sp. I <i>Fusarium</i> sp.....	38
4.1.2.1. IZOLACIJA DNK GLJIVA .....	38
4.1.2.2. KLONIRANJE SEKVENCI rDNK-ITS REGIONA .....	38
4.2. PROIZVODNI MIKROORGANIZAM I PRIPREMA INOKULUMA .....	39
4.3. HRANLJIVE PODLOGE I USLOVI BIOSINTEZE.....	41
4.3.1. HRANLJIVE PODLOGE .....	41
4.3.2. USLOVI BIOSINTEZE .....	43
4.4. ANALIZA UZORAKA KULTIVACIONE TEČNOSTI .....	45
4.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTAGONISTA <i>in vitro</i> .....	47
4.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTAGONISTA <i>in planta</i> .....	48
4.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	48
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>51</b>
5.1. PRIKUPLJANJE I IZOLACIJA PATOGENA .....	52
5.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLOVANIH PATOGENA .....	52
5.2.1. KLONIRANJE SEKVENCI rDNK-ITS REGIONA .....	52
5.2.2. ANALIZA SEKVENCI .....	52
5.3. POREĐENJE PROIZVODNE SPOSOBNOSTI <i>S. hygroscopicus</i> SA DRUGIM POTENCIJALNIM PRODUCERIMA ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	53
5.4. UTICAJ VREDNOSTI pH NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE.....	56
5.5. UTICAJ OSMOTSKOG PRITISKA NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE.....	57
5.6. UTICAJ DUŽINE TRAJANJA KULTIVACIJE NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE.....	59
5.7. ODABIR OPTIMALNIH IZVORA UGLJENIKA I AZOTA U PODLOZI ZA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	63
5.8. ISPITIVANJE UTICAJA RAZLIČITIH KOLIČINA UGLJENIKA, AZOTA I FOSFORA U PODLOZI ZA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	70
5.8.1. MATEMATIČKI MODELI ZA VREDNOSTI REZIDUALNOG SADRŽAJA GLICEROLA, AZOTA I FOSFATA .....	72
5.8.2. MATEMATIČKI MODELI ZA PREČNIKE ZONA INHIBICIJE NA ISPITIVANE IZOLATE SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	75
5.8.3. OPTIMIZACIJA SASTAVA PODLOGE .....	82

5.9. ISPITIVANJE UTICAJA ODABRANIH PROCESNIH PARAMETARA NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	85
5.9.1. TOKOVI KULTIVACIJE IZVEDENI U BIOREAKTORU PRI RAZLIČITIM INTENZITETIMA AERACIJE I MEŠANJA .....	86
5.9.2. PROIZVODNJA ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE TOKOM KULTIVACIJA IZVEDENIH U BIOREAKTORU PRI RAZLIČITIM INTENZITETIMA AERACIJE I MEŠANJA .....	93
5.10. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA INTENZITETA AERACIJE I MEŠANJA U PODLOZI ZA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE .....	100
5.10.1. DEFINISANJE MATEMATIČKIH MODELA ZAVISNIH PROMENLJIVIH .....	102
5.10.2. OPTIMIZACIJA PARAMETARA BIOPROCESA.....	111
5.11. PROVERA VALIDNOSTI DOBIJENIH REZULTATA U UVEĆANIM RAZMERAMA .....	114
5.11.1. ISPITIVANJE POTROŠNJE SUPSTRATA I PORASTA BIOMASE TOKOM BIOPROCESA .....	114
5.11.2. ISPITIVANJE DELOVANJA PROIZVEDENIH ANTAGONISTIČKIH AGENASA <i>in vitro</i> .....	115
5.11.3. POREĐENJE EKSPERIMENTOM ODREĐENIH I MODELOM PREDVIĐENIH VREDNOSTI ANALIZIRANIH PARAMETARA BIOPROCESA.....	117
5.11.4. ISPITIVANJE DELOVANJA PROIZVEDENIH ANTAGONISTIČKIH AGENASA <i>in planta</i> .....	118
<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>120</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>124</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>141</b>
8.1 PRILOG 1 .....	142
8.2. PRILOG 2.....	145

## **SPIŠAK OZNAKA, SIMBOLA I SKRAĆENICA**

---

PCR	reakcija lančane polimerizacije (engl. Polymerase Chain Reaction)
PDA	agarizovana podloga sa krompirom i dekstrozom (engl. Potato Dextrose Agar)
PDB	tečna podloga sa krompirom i dekstrozom (engl. Potato Dextrose Broth)
PCA	podloga sa šargarepom i krompirom (engl. Potato Carrot Agar)
MA	maltozni agar
WA	podloga od vode i agara
ITS1 i ITS4	prajmeri
pH	mera aktivnosti vodonikovih jona u rastvoru, (1)
Di	unutrašnji prečnik suda bioreaktora, (mm)
d	prečnik mešalice bioreaktora, (mm)
RSM	metoda odzivne površine funkcije (engl: Response Surface Methodology)
D	željena funkcija
R <sup>2</sup>	koeficijent determinacije
b <sub>0</sub>	odsečak
b <sub>1</sub> , b <sub>2</sub> , b <sub>3</sub>	linearni koeficijenti regresione jednačine
b <sub>11</sub> , b <sub>22</sub> , b <sub>33</sub>	kvadratni koeficijenti regresione jednačine
b <sub>12</sub> , b <sub>13</sub> , b <sub>23</sub>	koeficijenti interakcije regresione jednačine
Y <sub>i</sub>	modelovani odzivi
X <sub>i</sub>	ispitivani faktori
Gc	glukoza
F	fruktoza
L	laktoza
M	maltoza
S	skrob
Gy	glicerol
EK	ekstrakt kvasca
Pep	pepton
SB	sojino brašno
bez N	podloga koja u svom sastavu nije sadržala dodatni izvor azota
SM	sadržaj suve materije u uzorku, (%)
SS	suma kvadrata
Df	stepeni slobode
MS	sredina kvadrata
Sd	standardna devijacija

## **SIPISAK TABELA**

---



Tabela 3.1. Broj prirodnih produkata izolovanih iz tri grupe mikroorganizama do 2002. godine .....	25
Tabela 4.1. Sastav hranljivih podloga za test mikroorganizme .....	37
Tabela 4.2. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju ITS regiona izolata test gljiva .....	39
Tabela 4.3. Sastav hranljivih podloga za osvežavanje i umnožavanje proizvodnog mikroorganizma .....	40
Tabela 4.4. Box-Behnkenov plan eksperimenta i varirane vrednosti parametara .....	43
Tabela 4.5. Plan eksperimenta i varirane vrednosti ulaznih parametara .....	45
Tabela 5.1. Dvofaktorijalna analiza varijanse inhibicije rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> (KA10 i T1Jg3) i <i>F. avenaceum</i> (KA12 i KA13) .....	53
Tabela 5.2. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije ( $\pm$ Sd) izolata <i>A. alternata</i> (KA10 i T1Jg3) i <i>F. avenaceum</i> (KA12 i KA13) prouzrokovane delovanjem ispitanih mikroorganizama .....	54
Tabela 5.3. Rezultati faktorijalne analize varijanse: izvori varijacije zona inhibicije zone nakon 72 h inkubacije na 27 ° C .....	62
Tabela 5.4. Dankanov test višestrukih poređenja: srednje vrednosti prečnika zona inhibicije rasta micelije tokom sedam dana kultivacije .....	62
Tabela 5.5. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju <i>S. hygroscopicus</i> na inhibiciju rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> KA10 .....	64
Tabela 5.6. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> KA10 .....	65
Tabela 5.7. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju <i>S. hygroscopicus</i> na inhibiciju rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> T1Jg3 .....	65
Tabela 5.8. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> T1Jg3 .....	66
Tabela 5.9. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju <i>S. hygroscopicus</i> na inhibiciju rasta micelije izolata <i>F. avenaceum</i> KA12 .....	67
Tabela 5.10. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata <i>F. avenaceum</i> KA12 .....	67
Tabela 5.11. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju <i>S. hygroscopicus</i> na inhibiciju rasta micelije izolata <i>F. avenaceum</i> KA13 .....	68
Tabela 5.12. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata <i>F. avenaceum</i> KA13 .....	68

Tabela 5.13. Vrednosti rezidualnog ugljenika, rezidualnog azota, rezidualnog fosfata i prečnika zone inhibicije sva četiri test izolata u skladu sa Box- Behnkenovim eksperimentalnim planom .....	71
Tabela 5.14. Analiza varijanse modelovanih odziva.....	72
Tabela 5.15. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za sadržaj rezidualnog glicerola, azota i fosfata .....	73
Tabela 5.16. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za prečnike zona inhibicije na testirane izolate .....	75
Tabela 5.17. Prvi set optimizacije sastava podloge: uslovi i dobijene optimalne vrednosti.....	82
Tabela 5.18. Drugi set optimizacije sastava podloge: uslovi i dobijene optimalne vrednosti .....	83
Tabela 5.19. Treći set optimizacije sastava podloge: uslovi i dobijene optimalne vrednosti .....	85
Tabela 5.20. Vrednosti rezidualnog ugljenika, rezidualnog azota, suve materije, rezidualnog fosfata i prečnika zone inhibicije sva četiri test izolata u skladu sa eksperimentalnim planom .....	101
Tabela 5.21. Analiza varijanse modelovanih odziva za biosintezu skladišnih patogena jabuke .....	102
Tabela 5.22. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za sadržaj rezidualnog glicerola, azota i fosfata i sadržaja suve materije.....	103
Tabela 5.23. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za prečnike zona inhibicije na testirane izolate .....	105
Tabela 5.24. Prvi set optimizacije: uslovi i dobijene optimalne vrednosti.....	112
Tabela 5.25. Drugi set optimizacije: uslovi i dobijene optimalne vrednosti.....	113
Tabela 5.26. Treći set optimizacije: uslovi i dobijene optimalne vrednosti.....	114
Tabela 5.27. Poređenje modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti.....	117
Tabela 5.28. Srednje vrednosti prečnika nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke nakon 10 dana inkubacije.....	119

## **SPISAK SLIKA**

---

Slika 3.1. Bolesti ploda jabuke izazvane gljivom <i>Alternaria</i> spp.....	12
Slika 3.2. Simptomi fuzarijumske truleži na jabukama .....	16
Slika 3.3. Koraci u razvoju bioprocesa. Dijagram toka procesa (DTP) .....	20
Slika 3.4. Životni ciklus streptomiceta .....	23
Slika 5.1. Inhibicija rasta micelije primenom <i>S. hygroscopicus</i> (a) i kontrola (b) (1) <i>A. alternata</i> KA10; (2) <i>A. alternata</i> T1Jg3; (3) <i>F. avenaceum</i> KA12; (4) <i>F. avenaceum</i> KA13.....	55
Slika 5.2. Uticaj vrednosti pH podloge na produkciju antagonista skladišnih patogeno jabuke primenom <i>S. hygroscopicus</i> na izolate: <i>A. alternata</i> (a) i <i>F. avenaceum</i> (b) .....	56
Slika 5.3. Uticaj vrednosti osmotskog pritiska na produkciju antagonista skladišnih patogeno jabuke primenom <i>S. hygroscopicus</i> na izolate <i>A. alternata</i> (a) i <i>F. avenaceum</i> (b) .....	58
Slika 5.4. Promena sadržaja glukoze, ukupnog azota i suve materije tokom 7 dana kultivacije <i>S. hygroscopicus</i> u laboratorijskom bioreaktoru.....	60
Slika 5.5. Promena srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije četiri izolata skladišnih patogeno tokom 7 dana kultivacije .....	61
Slika 5.6. Maksimalni prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> KA10 (a), <i>A. alternata</i> T1Jg3 (b), <i>F. avenaceum</i> KA12 (c) i <i>F. avenaceum</i> KA13 (d) formirani delovanjem 100 µl supernatanta <i>S. hygroscopicus</i> nakon 72 h inkubacije.....	63
Slika 5.7. Inhibicija rasta micelije izolata <i>A. alternata</i> KA10 (1), <i>A. alternata</i> T1Jg3 (2), <i>F. avenaceum</i> KA12 (3) i <i>F. avenaceum</i> KA13 supernatantom kultivacione tecnosti <i>S. hygroscopicus</i> na podlozi koja je sadržala Gy+bez N.....	69
Slika 5.8. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>A. alternata</i> KA10 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; b) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; c) glicerol.....	78
Slika 5.9. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>A. alternata</i> T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; b) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; c) glycerol.....	78
Slika 5.10. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>F. avenaceum</i> KA12 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; b) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; c) glycerol.....	80
Slika 5.11. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>F. avenaceum</i> KA13 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; b) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; c) glycerol.....	80
Slika 5.12. Prvi set optimizacije sastava podloge: pojedinačne i ukupna željena funkcija .....	82

Slika 5.13. Drugi set optimizacije sastava podloge: pojedinačne i ukupna željena funkcija .....	83
Slika 5.14. Treći set optimizacije sastava podloge: pojedinačne i ukupna željena funkcija .....	85
Slika 5.15. Tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 100 o/min i intenzitetom aeracije: a) 0,5 l/l/min; b) 1 l/l/min; c) 1,5 l/l/min .....	87
Slika 5.16. Tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 200 o/min i intenzitetom aeracije: a) 0,5 l/l/min; b) 1 l/l/min; c) 1,5 l/l/min .....	89
Slika 5.17. Tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 300 o/min i intenzitetom aeracije: a) 0,5 l/l/min; b) 1 l/l/min; c) 1,5 l/l/min .....	91
Slika 5.18. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru sa mešanjem 100 o/min i intenzitetom aeracije: a) 0,5 l/l/min; b) 1 l/l/min; c) 1,5 l/l/min .....	94
Slika 5.19. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru sa mešanjem 200 o/min i intenzitetom aeracije: a) 0,5 l/l/min; b) 1 l/l/min; c) 1,5 l/l/min .....	96
Slika 5.20. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru sa mešanjem 300 o/min i intenzitetom aeracije: a) 0,5 l/l/min; b) 1 l/l/min; c) 1,5 l/l/min .....	98
Slika 5.21. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>A. alternata</i> KA10 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja .....	107
Slika 5.22. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>A. alternata</i> T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja .....	107
Slika 5.23. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>F. avenaceum</i> KA12 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja .....	110
Slika 5.24. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive <i>F. avenaceum</i> KA13 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja .....	110
Slika 5.25. Tok kultivacije <i>S. hygroscopicus</i> u bioreaktoru uvećanih razmera .....	115
Slika 5.26. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru uvećanih razmera ...	116
Slika 5.27. Inhibicija rasta micelije primenom <i>S. hygroscopicus</i> (a) i kontrola (b) (1) <i>A. alternata</i> KA10; (2) <i>A. alternata</i> T1Jg3; (3) <i>F. avenaceum</i> KA12; (4) <i>F. avenaceum</i> KA13.....	117

Slika 8.1. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog glicerola pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) $K_2HPO_4$ ; b) $(NH_4)_2SO_4$ ; c) glicerol.....	142
Slika 8.2. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog azota pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) $K_2HPO_4$ ; b) $(NH_4)_2SO_4$ ; c) glicerol.....	143
Slika 8.3. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog fosfata pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) $K_2HPO_4$ ; b) $(NH_4)_2SO_4$ ; c) glicerol.....	144
Slika 8.4. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog glicerola pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja.....	145
Slika 8.5. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog azota pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja.....	146
Slika 8.6. Uticaj interakcije dva faktora na količinu suve materije pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja.....	147
Slika 8.7. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog fosfata pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora: a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja.....	148

# 1. UVOD

Plodovi jabuke su tokom čitave godine prisutni u ishrani beba, dece i odraslih ljudi zbog čega je kvalitet i zdravstvena bezbednost ovih namirnica od izuzetnog značaja. Tokom vegetacije i tokom čitavog perioda skladištenja transporta i prodaje, plodovi jabuke su podložni infekciji različitim vrstama fitopatogenih gljiva koji plod koriste kao supstrat za razvoj, rast i razmnožavanje te uzrokuju gubitke koji mogu da iznose od 50% do 80% ukupnog prinosa. Veliki broj fitopatogenih gljiva su prouzrokovatori bolesti jabuka međutim, među značajnim prouzrokovateljima bolesti jabuka u skladištima spominju se gljive iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* o čijoj kontroli praktično i nema podataka u naučnoj literaturi. U Srbiji nema registrovanih preparata za tretiranje plodova jabuke posle berbe, a prouzrokovatori truleži plodova se pretežno suzbijaju sintetičkim fungicidima koji se primenjuju pre berbe plodova.

Smatra se da su zdravstveno bezbedni plodovi jabuke pre svega zdravi plodovi, bez prisustva fitopatogenih gljiva i bez ostataka fungicida. Sve veća briga oko primene sintetičkih fungicida zbog njihove toksičnosti, razvoja rezistentnosti patogena na fungicide i štetnih efekata na životnu sredinu i zdravlje ljudi, doveli su do potrebe za pronalaženjem alternative hemijskoj zaštiti. Iz ovih razloga traga se za novim rešenjima, a jedno od mogućih se ogleda upravo u primeni biotehnoških postupkom proizvedenih agenasa koji imaju niz prednosti u odnosu na sintetičke preparate, dok im je glavni nedostatak njihova visoka cena. Međutim, ispitivanje mikroorganizama producera ovih agenasa kao i optimizacija sastava podloge i uslova kultivacije za njihovo dobijanje, može direktno uticati na prevazilaženje ovog nedostatka. Aktinomicete roda *Streptomyces* poznati su po svojoj sposobnosti da suzbijaju rast različitih gljivičnih patogena zbog čega je agroindustrija veoma zainteresovana za ovu grupu mikroorganizama kao potencijalnih producera agenasa koji bi se mogli koristiti u biološkoj zaštiti plodova jabuke.

Svi dostupni naučni podaci o upotrebi streptomiceta uglavnom se odnose na odabir proizvodnog mikroorganizma i optimizaciju podloge (uglavnom sintetičke) za proizvodnju željenih metabolita u laboratorijskim uslovima i u malim zapreminama. Međutim, objavljenih istraživanja o uslovima proizvodnje u laboratorijskom bioreaktoru koja se pre svega odnose na optimizaciju procesnih parametara, praktično i da nema, a upravo prelazak sa nivoa erlanmajera na nivo laboratorijskog bioreaktora predstavlja kritičan korak u razvoju bioprocasa jer podrazumeva značajnu promenu uslova izvođenja. Kada se aerobni mikroorganizam koristi kao proizvodni u ovom segmentu razvoja bioprocasa, neophodno je pre svega definisati intenzitet aeracije i mešanja koji će omogućiti održavanje uniformnih i adekvatnih uslova za maksimizaciju prinosa željenih antagonista skladišnih patogena jabuke u čitavoj zapremini bioreaktora.

Rezultati optimizacije biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus* na nivou laboratorijskog bioreaktora predstavljali bi osnovu za dalje uvećanje razmera do industrijskih, što je ključni korak ka potencijalnoj industrijalizaciji predloženog proizvodnog postupka. Sve strožiji zahtevi u pogledu kvaliteta prehrambenih proizvoda, stav potrošača i samo zakonodavstvo ukazuju da će biološki preparati za zaštitu bilja u budućnosti zauzeti veliki deo tržišta pesticide. U našoj zemlji je ovaj segment zaštite bilja na samom početku razvoja te rezultati dobijeni u okviru ovih



istraživanja mogu dati značajan doprinos razvoju ove naučne oblasti, ali i omogućiti potencijalnu komercijalnu proizvodnju i primenu bioloških preparata za zaštitu jabuka u skladištima.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je optimizacija biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus* na nivou laboratorijskog bioreaktora u pogledu odabira izvora ugljenika i azota i količina izvora ugljenika, azota i fosfora u hranljivoj podlozi za biosintezu željenih antagonističkih agenasa, kao i parametara biosinteze sa posebnim osvrtom na intenzitet primenjene aeracije i mešanja. Matematički modeli dobijeni primenom postupka odzivne površine će doprineti boljem razumevanju uticaja različitih vrednosti navedenih faktora, kao i njihovih međusobnih interakcija na ishod biosinteze antagonističkih agenasa skladišnih patogena jabuke primenom mikroorganizma *Streptomyces hygroscopicus*. Pored navedenog, cilj ovih istraživanja obuhvata i izvođenje biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus* pri definisanim optimalnim uslovima radi provere validnosti dobijenih rezultata i praćenja toka bioprocesa pri definisanim uslovima.

Realizacija osnovnog cilja ove doktorske disertacije zahteva ispunjenje sledećih specifičnih ciljeva:

- prikupljanje plodova jabuke sa simptomima truleži iz skladišta na teritoriji Republike Srbije, izolovanje prouzrokovala truleži iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* i njihova identifikacija;
- poređenje antagonističkog delovanja izolata *Streptomyces hygroscopicus* sa drugim potencijalnim mikroorganizmima producerima antagonističkih agenasa;
- odabir optimalnih izvora ugljenika i azota u hranljivoj podlozi za biosintezu antagonističkih agenasa skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus*;
- odabir optimalne vrednosti pH i optimalne koncentracije natrijum hlorida u hranljivoj podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus*;
- primena metode odzivne površine za dobijanje matematičkih modela koji opisuju uticaj različitih količina odabranih količina ugljenika, azota i fosfora u hranljivoj podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus*;
- primena metode željene funkcije za definisanje optimalnih količina odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora u hranljivoj podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygroscopicus* pri kojima se ostvaruje željena efikasnost bioprocesa;

- ispitivanje uticaja različitog intenziteta aeracije i mešanja na biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygrosopicus* u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 3 l i optimizacija vrednosti ovih parametara;
- izvođenje biosinteze antagonističkih agenasa skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygrosopicus* pri definisanim optimalnim uslovima radi provere validnosti dobijenih rezultata i praćenja toka bioprocesa pri definisanim uslovima.

### **3. PREGLED LITERATURE**

---

### 3.1. SKLADIŠNI PATOGENI JABUKE

Jabuka je jedna od najvažnijih voćki koja se troši tokom cele godine. Pored toga, njeni plodovi se mogu zamrzavati i kao takvi kasnije upotrebljavati u svrhu različitih vidova prerade (sok, kompot, jabukovača, sirće i dr.). Plodovi jabuke su tokom čitave godine prisutni u ishrani beba, dece i odraslih, te je njihov kvalitet i zdravstvena ispravnost od izuzetnog značaja (Grahovac, 2014). Po proizvodnji, prometu i potrošnji jabuka se u svetu, među voćkama, nalazi na trećem mestu i dolazi odmah iza citrusa i banane. Prema podacima FAO (engl. Food and Agriculture Organisation) (2008) prosečna proizvodnja jabuke u svetu, u periodu od 1998 do 2007. godine iznosila je oko 59 miliona tona. Glavni proizvođač je Kina sa 22 miliona tona, što čini 37% od ukupne svetske proizvodnje. Za njom slede SAD (7%), Italija (4%), Francuska (4%), Turska (4%), Iran (4%), Rusija (3%), Nemačka (3%), Poljska (3%) itd. Prosečna godišnja proizvodnja jabuke u Srbiji za period od 2006. do 2010. godine iznosila je 248592 tona ([www.fao.stat.org](http://www.fao.stat.org)).

S obzirom da je tržište jabuka veoma zahtevno, proizvođači nakon uspešnog proizvodnog procesa u polju posebnu pažnju moraju posvetiti njihovom skladištenju. Zahvaljujući sposobnosti dugog čuvanja, jabuka predstavlja predmet svetske trgovine tokom čitave godine, a kvalitetnim čuvanjem omogućava se njihova prodaja na tržištu u vreme kada dostižu najvišu cenu (Magazin i sar., 2013). Nakon berbe, plodovi jabuke se dopremaju u hladnjaču sa kontrolisanim uslovima čuvanja sa ciljem održavanja visokog unutrašnjeg i spoljašnjeg kvaliteta jabuke. U praksi se koriste dva tipa hladnjača: hladnjača sa normalnom atmosferom (NA) u kojoj se temperatura održava na 2-3°C i hladnjača sa kontrolisanom atmosferom (CA) u kojima se osim temperature kontroliše i cirkulacija i vlažnost vazduha kao i sastav atmosfere (Obradović i sar., 2013). Na žalost i pored stroge kontrole uslova, plodovi jabuke su tokom skladištenja podložni infekciji različitim fitopatogenim mikroorganizmima koji plod koriste kao supstrat za razmnožavanje, rast i razvoj (Snowdon i sar., 1990). Tokom čuvanja ili neposredno nakon iznošenja iz skladišta, na plodovima se mogu javiti različita fiziološka i oboljenja izazvana fitopatogenim gljivama. Razgradnja struktura ploda jabuke koja nastaje usled delovanja enzima fitopatogenih gljiva manifestuje se u vidu simptoma „truleži“ čitavog ploda, dela ploda, u vidu tamnih pega na pokožici ploda ili ograničenog tamnjenja mesa na poprečnom preseku ploda (Snowdon i sar., 1990). Do ovih pojava dolazi usled neadekvatne prihrane jabuke u toku vegetacije, nedostatka mineralnih materija, neodgovarajuće nege tokom uzgoja, neblagovremene i neadekvatne berbe plodova. Na kvalitet plodova jabuke pored tehnoloških postupaka koji se primenjuju do i tokom berbe plodova značajno utiču i neadekvatni uslovi skladištenja plodova (temperatura, koncentracija gasova) (Grahovac, 2014). Za svaku sortu jabuke koja se čuva duži vremenski period u skladištima propisani su odgovarajući uslovi koji se odnose na odgovarajuću temperaturu, vlagu i gasove. I pored adekvatne tehnologije proizvodnje i čuvanja plodova jabuke, pojava truleži plodova posle berbe je uobičajena pojava te je bitno da se bolest na vreme uoči i inficirani plodovi voća eliminišu iz skladišnog prostora da se zaraza ne bi dalje širila.

Kao najznačajniji prouzrokovani truleži plodova jabuke u skladištu navode se sledeće fitopatogene gljive: *Penicillium italicum* Wehmer, *Penicillium expansum* (Lk.) Thom., *Alternaria alternata* (Fr) Keissler, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Monilinia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *Colletotrichum acutatum* Simmonds, *Pezizula malicorticis* (H.S. Jacks.) Nannf., a u poslednje vreme utvrđeno je prisustvo *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. i drugih vrsta iz roda *Fusarium* (Sever i sar., 2012; Kou i sar., 2014; Wenneker i sar., 2016). Jedna od najčešćih *Fusarium* vrsta koje se javljaju na jabuci jeste *F. avenaceum*. Gljive iz rodova *Penicillium*, *Alternaria* i *Fusarium* pored gubitaka koje prouzrokuju su i potencijalni proizvođači mikotoksina štetnih za ljudsko zdravlje, te je njihovo suzbijanje od velikog značaja. Na žalost, tema suzbijanja patogena iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* na uskladištenim plodovima jabuke do sada nije detaljnije obrađivana.

Ekonomska šteta koju fitopatogene gljive prouzrokuju u uslovima skladištenja može biti velika, a precizna identifikaciju fitopatogenih gljiva predstavlja ključan preduslov za njihovo suzbijanje. Pored ispitivanja fizioloških i morfoloških karakteristika mikroorganizma, za njihovu preciznu identifikaciju neophodno je izvršiti i molekularnu identifikaciju. Danas se najčešće koriste geni za ribozomalne DNK (rDNK) kao molekularni hronometri pri analiziranju mikrobiološke filogenije i sistematike. Takođe, za identifikaciju taksonomskih grupa najčešće se koristi metoda amplifikacija ribozomalne DNK (rDNK) reakcijom lančane polimerizacije (PCR) pomoću odgovarajućih prajmera. Poređenjem dobijenih rDNK sekvenci sa bazom podataka omogućava se rekonstrukcija filogenetske pozicije ispitivanog soja, a samim tim tako dobijeni rezultati se mogu iskoristiti za determinaciju filogenetskih i evolutivnih odnosa između organizama (Mehling i sar., 1995).

Kao savremen pristup u identifikaciji biljnih patogena, molekularne metode imaju veliku prednost u primeni za preciznu identifikaciju, karakterizaciju, utvrđivanje strukture populacije, određivanje puteva introdukcije i drugih brojnih aspekata filogeografije i epidemiologije različitih patogena. Zbog visoke specifičnosti i osetljivosti, ove metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja prouzrokovanih fitopatogenim gljivama (Ristić i sar., 2014).

### 3.1.1. SKLADIŠNI PATOGENI RODA *Alternaria*

*Alternaria* vrste su poznate kao grupa značajnih biljnih patogena i česti su prouzrokovani truljenja i propadanja poljoprivrednih kultura. Prema USDA, Systematic Botany and Mycology Fungus-Host Distribution Database, do sada je zabeleženo preko 380 biljaka domaćina roda *Alternaria* (Battilani i sar., 2009).

Postoji više različitih klasifikacija roda *Alternaria* međutim, najčešće se navodi klasifikacija po kojoj ovaj rod pripada carstvu *Fungi*, razdelu *Ascomycota*, klasi *Euascmycetes*, redu *Pleosporales* i familiji *Pleosporaceae* (Battilani i sar., 2009; USDA ARS Fungal Database). S

obzirom da kod većine *Alternaria* vrsta nije identifikovan polni stadijum, ovaj rod je klasifikovan u zbirnu grupu *Deuteromycetes* (*Fungi Imperfecti*-nesavršene gljive) (Thomma, 2003).

Rod *Alternaria* je najznačajniji kontaminanti pšenice, suncokreta, paradajza, citrusnog voća i jabuke. Zbog rasta i razmnožavanja na niskim temperaturama vrste ovog roda odgovorne su i za kvarenje proizvoda tokom transporta i skladištenja. *Alternaria* vrste proizvode više od 70 sekundarnih metabolita, od kojih su samo neki svrstani u mikotoksine zbog štetnog delovanja na ljude i životinje. Najznačajniji od njih, alternariol (AOH), alternariol monometil etar (AME), tentoksin (TEN), tenuazonična kiselina (TeA), alvertoksini (ATX-I i II) i drugi pronađeni su na zaraženim plodovima jabuke (Kocić-Tanacković i Dimić, 2013; Battilani i sar., 2009). AOH, AME i ATX I su pokazali stabilnost na 80°C u toku 20 min. U jabukama i prerađevinama od jabuke i drugog voća je utvrđena pojava niskog sadržaja AOH i AME. Trenutno ne postoje propisi za *Alternaria* toksine u hrani u Evropi i drugim regionima sveta, međutim njihov nalaz u sirovinama i proizvodima ukazuje da bi mogli predstavljati veliku opasnost po zdravlje ljudi (Kocić-Tanacković i Dimić, 2013).

*Alternaria alternata*, kao najznačajniji predstavnik roda *Alternaria*, prisutna je u mnogim delovima sveta i odgovorna je za bolesti različitih voćnih kultura nakon berbe. Ovo je ujedno prva vrsta roda *Alternaria* koju je Nees otkrio davne 1817. godine (Rotem, 1998, 58. Woudenberg i sar., 2013). U literaturi se spominju neke bolesti voća izazvane ovom fitopatogenom gljivom: trulež srži Fuji jabuka (Gao i sar., 2013), tačkavost plodova jabuke (Harteveld i sar., 2013), trulež kore jabuka (Shtienberg, 2012), ali i trulež srži breskve (Pose i sar., 2010), truljenje manga (Amin i sar., 2011) i druge. Pored ove vrste u literaturi se najčešće spominju i *A. arborescens*, *A. tenuissima* i *A. mali* kao prouzrokovaci infekcija listova i plodova jabuka (Harteveld i sar., 2014a).

### 3.1.1.1. PREGLED STANJA UČESTALOSTI RODA *Alternaria* NA JABUKAMA U SVETU I KOD NAS

Za vrste roda *Alternaria* možemo reći da su raširene u celom svetu kao prouzrokovaci bolesti kako na listovima tako i na plodovima jabuka. Tako je u Evropi, na primer, vrsta *A. alternata* opisana još početkom 1960-tih godina kao parazit uskladištenih plodova jabuke. Pored toga, *A. mali*, poznata kao *A. alternata* jabučni patotip, identifikovana je kao prouzrokovac bolesti jabuka u Japanu, Kini, Koreji, SAD, Rusiji, Turskoj, Brazilu i Jugoslaviji (Harteveld i sar., 2014).

U SAD se prvi put 1924. godine spominje bolest listova jabuke izazvana *Alternaria* vrstom, a danas je ova bolest jabuka rasprostranjena širom sveta. Zanimljivo je da u Severnoj Americi sve do 1987. godine nisu zabeležene ekonomske štete već samo beznačajna pojava alternarijske pegavosti jabuke. U Japanu je alternarijska bolest plodova jabuke prvi put prijavljena 1950. godine, a tek nedavno u Australiji i Italiji. U Australiji se ova bolest prvi put



javlja na listovima jabuke 1990. godine a tek 2002. godine prvi put se spominju tzv. pegavost na plodovima jabuke koje prouzrokuju *Alternaria* vrste (Harteveld i sar., 2014a). Pojedine *Alternaria* vrste (*A. arborescens*, *A. tenuissima* i *A. alternata*) izazivaju oba tipa bolesti jabuka u Italiji (Rotondo i sar., 2012). U severnoj Italiji (oblast Alto Adige) iznenada je zabeležena veća prisutnost ove bolesti na nekim osetljivim sortama jabuke (npr. Gala, Zlatni delišes, Pink Lady) tokom 2000. i 2003. godine nakon vrlo toplih sezona (Harteveld i sar., 2014).

Na našem području se sredinom 1970-ih godina u Sloveniji prvi put upozorava na vrstu *Alternaria tenuis* kao parazita plodova jabuke. *Alternaria* je u Jugoslaviji izolovana iz sorte Crveni delišes prikupljenih sa sedam lokacija na teritoriji Jugoslavije od 1993. do 1995. godine. Međutim, na teritoriji Savezne Republike Jugoslavije se tek 1996. godine upozoravaju na njenu prvu ozbiljnu pojavu i pojavu vrste *A. mali* (Bulajić i sar., 1996).

### 3.1.1.2. SIMPTOMI *Alternaria* spp. NA PLODOVIMA JABUKE

Smatra se da je *Alternaria* spp. uzročnik 20-40% poljoprivrednog otpada (Battilani i sar., 2009). Takođe, *Alternaria* spp. je prouzrokovatelj značajnih gubitaka plodova jabuke, naročito visokovrednih sorti Gala, Fuji, Pink Lady i Zlatni i Crveni delišes (Horloch, 2006). U skorije vreme posebno na plodovima sorti Crveni i Zlatni delišes ali i kod drugih sorti, primećena je učestalija pojava truleži semenjače (engl. moldy core). Bolest se može javiti već u polju. Trulež jezgra jabuke izazivaju *Alternaria* vrste. Ova bolest se karakteriše rastom micelije gljive unutar semene šupljine bez infekcije samog mesa ploda. Spoljašnji simptomi su retki međutim, ovakvi plodovi ranije opadaju sa stabala. Bolest se ne može uočiti sve dok se jabuka ne prereže na pola. Zanimljivo je da infekcija nastaje još tokom oprašivanja biljke tj. tokom cvetanja iste, a vlažno vreme znatno doprinosi njenom razvoju. Nekoliko *Alternaria* spp. se spominju kao prouzrokovatelj truleži semena jabuke (Kang i sar., 2002).

Alternarijska pegavost plodova jabuke manifestuje se sitnim ( $\pm 2$  mm), blago uleglim, svetlo do srednje braon pegama koje se pojavljuju na lenticelama jabuka. Ovo se javlja uglavnom nakon padavina i obično ne ranije od 6-8 nedelja pre berbe. Zanimljivo je da se ove pege ne pojavljuju tokom skladištenja i u hladnjačama. Međutim, kada se plodovi iskladište često dolazi do povećanja već postojećih pega a može da dođe i do nastajanja novih što ujedno predstavlja idealnu podlogu za neke druge infekcije (Horloch, 2006).

Alternarijska trulež (engl. *Alternaria* rot), prouzrokovana uglavnom gljivama *A. alternata*, *A. tenuissima* i *A. arborescens*, može se pojaviti na jabukama u bilo kojoj fazi proizvodnje. Spore patogena naseljavaju najslabije ili odumrle delove biljke i preko njih se šire na plodove. Ovaj mikroorganizam je pronađen kako na jabukama u voćnjaku tako i tokom skladištenja. Međutim, ovaj patogen ne može da izazove trulež, izuzev u slučajevima kada je tkivo prethodno oštećeno (Kang i sar., 2002; <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/marketdiseases/alternaria.htm>).

Tipični simptomi alternarijske truleži su manje ili više okrugle, braon do crne lezije koje se vrlo često javljaju na delovima oštećenja samog ploda u vidu procepa. Propadanje tkiva nastaje veoma sporo u hladnim uslovima. Kod zrelijeg ili starog voća, ove promene su jasnije i tamnije a truli delovi su uglavnom sunderaste konzistencije (Filajdić i Sutton, 1995; <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/marketdiseases>). Na slici 3.1 prikazane su bolesti različitih vrsta jabuke izazvane *Alternaria* vrstama.



Slika 3.1. Bolesti ploda jabuke izazvane gljivom *Alternaria* spp.

Oštećenja prouzrokovana ovom gljivom mogu da se jave i na listovima krajem proleća ili početkom leta u obliku malih, okruglih pega koja se šire u prečniku od 1,5-5 mm. Lezije se postepeno mogu proširivati postajati tamnije. Sve ovo postepeno dovodi do toga da lišće požuti i dolazi do defolijacije (Harteveld i sar., 2014a).

### 3.1.1.3. IDENTIFIKACIJA *Alternaria* spp.

Rod *Alternaria* je pronađen u gotovo svakom ekosistemu, zemljištu, organskim ostacima i nalazi se na listi prvih deset fitopatogena u pogledu broja domaćina. Svakako da je proučavanje uticaja *Alternaria* spp. i njena tačna identifikacija veoma bitna u pogledu kontrole i ublažavanja njenih štetnih efekata na domaćina (Taralova i sar., 2011).

Do danas je *Alternaria* rod uglavnom opisan na osnovu morfoloških osobina i/ili na osnovu specifičnosti domaćina koga parazitiraju. Smatra se da je molekularna razlika među *Alternaria* vrstama minimalna (Taralova i sar., 2011).

*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. mali* i *A. arborescens* su najznačajnij prouzrokovajući bolesti jabuka iz roda *Alternaria*. Blagojević i saradnici su na osnovu proučavanja morfoloških osobina konidija (boja, oblik, dužina i širina tela konidije, prisutnost i dužina vrata konidija, broj longitudinalnih i transverzalnih septi) vršili identifikaciju ispitivanih izolata. Oni su utvrdili da jedna grupa obuhvata izolate kod kojih su konidije elipsoidne, u lančanim nizovima i do 15 u nizu. Dimenzije konidiospora u proseku za ovu grupu izolata iznosile su 12-45 x 5-14  $\mu\text{m}$ . U proseku ove konidije su imale 3- 4 transverzalne septe i 1-3 longitudinalne septe. Kljun odnosno sam vrh konidija je bio kratak ovalnog oblika ili se nije

ni formirao. Boja konidija je braonkasta. Prema literaturnim podacima veličina i struktura ovih konidija odgovara vrsti *Alternaria alternata*. Kod ovih izolata micelija je vazdušaste teksture, tamnosive boje, pravilnih ivica, ivičnih linija oko 5 mm sa blago ispupčenim centralnim delom micelije. Na ispitivanim podlogama (V8 agar, podlozi sa krompirom i dekstrozom (PDA, engl. Potato Dextrose Agar) i podlozi sa šargarepom i krompirom (PCA, engl. Potato Carrot Agar) moguće je uočiti koncentrične krugove koji zapravo predstavljaju zone sporulacije. Sa naličja micelija je mrka, ravna i ne uočavaju se promene u boji podloge (Blagojević i sar., 2014).

Kod *A. tenuissima* konidije na vrhu lanca su male, ovalne i neseptirane dok su mlade. Tokom vremena, mogu da se formiraju 2-3 poprečne septe. Veoma retko dolazi do formiranja uzdužnih septi. Konidije koje su bliže bazi i konidiofore, mogu biti elipsoidnog oblika sa vidnim kljunom. One najčešće imaju 2-7 poprečnih septi i retko do nekoliko uzdužnih septi. Konidije koje su u sredini lanca takođe mogu biti elipsoidnog oblika sa više uzdužnih septi. Boja i količina micelije varira u zavisnosti od podloge (Jasnić i sar., 2011; Serdani i sar., 2002). Ispitivanjem *A. tenuissima* na tri najznačajnije podloge: V8 podlozi, MA – maltozni agar i PCA podlozi, najslabiji rast uočen je na MA podlozi. Na ovoj podlozi, micelija se nije gusto razvijala a zone su slabo uočljive. Boja kolonija kreće se od tamno maslinaste do crne u samom centru, dok je na marginama bila svetlije obojena. Micelija formirana na PCA podlozi je kompaktna, gušća sa 2-4 različito obojene zone. Centralni deo je zelenkasto crne boje dok je marginalni deo bio sive boje. Međutim, jasno se uočavaju koncentrične zone različitih boja, od crne u samom centru preko tamno maslinasto zelene pa sve do sive. Na V8 podlozi formira se gusta i kompaktna vazdušasta micelija sa 3-4 različito obojene koncentrične zone. Boja varira od zelenkasto-crne u samom centru, do sivkasto crne na samim marginama (Jasnić i sar., 2011).

Kod *A. mali* hife su kratke (često ne duži od njihove širine), uglavnom se ne granaju i širine su 3-8  $\mu\text{m}$ . Konidije stvaraju 3-9 lanaca širine u proseku 28 x 12  $\mu\text{m}$ . Na Petri ploči se jasno uočava njihova boja koja varira od boje čilibara, preko maslinasto zelena pa sve do crne. Boja varira u zavisnosti od starosti kulture. *A. malise* u polju širi preko konidija, a kišno vreme može značajno da doprinese njenom širenju (Roberts, 1924).

*Alternaria arborescens* ima duge (oko 1000  $\mu\text{m}$ ) jasno definisane konidiofore sa nekoliko terminalnih grana. Primarne konidiofore stvaraju kratak ali veoma razgranat lanac konidija. *A. arborescens* proizvodi tamne maslinasto zelene kolonije (Serdani i sar., 2002).

Generalno, klasifikacija *Alternaria* vrsta je prilično složena (Chou i Wu, 2002; Hong i sar., 2005). Kako bi se sistematski okarakterisale *Alternaria* vrste, primenjuju se molekularne metode. Metode zasnovane na ispitivanju DNK kod *Alternaria* vrsta opisane su u istraživanjima Pavon i saradnika (Pavon i sar., 2010). Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje umnoženih fragmenata DNK, uspešno su primenjeni za detekciju i identifikaciju ispitivanih izolata *Alternaria* vrste. Primenom para univerzalnih prajmera ITS (engl. Internal Transcribed Spacer), ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) i ITS4

(TCCTCCGCTTATTGATATGC) koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona (ITS1-5.8S-ITS2) ribozomalne DNK eukariota i poređenjem amplifikovanih fragmenata ustanovljeno je prisustvo fragmenata očekivane veličine oko 550 bp (baznih parova) (Ristić i sar., 2014), odnosno oko 600 bp (Đisalov, 2015).

Danas je najvažniju kolekciju *Alternaria* vrsta sumirao Simmons (2007) čija je taksonomija izvršena na osnovu morfoloških karakteristika. U njegovom delu priznate su 275 *Alternaria* vrste (Simmons, 2007; Woudenberg i sar., 2013).

### 3.1.2. SKLADIŠNI PATOGENI RODA *Fusarium*

Vrste roda *Fusarium* obuhvataju veliki broj ekonomski značajnih vrsta biljnih patogena. Ovaj rod prouzrokuje razne bolesti na biljkama, a posebno voća i povrća. *Fusarium* spp. može izazvati alergijske reakcije kod čoveka i mikotoksikozu kod ljudi i životinja nakon unošenja hrane kontaminirane toksinima koje proizvode (Nucci i Anaissie, 2007). Široko je rasprostranjen u zemljištu, vazduhu, otpacima organskog porekla, ali i u vodi širom sveta. Dakle, može se zaključiti da *Fusarium* vrste imaju sposobnost da rastu na širokom spektru podloga. Po najprihvaćenijoj klasifikaciji ovaj rod je svrstan u carstvo *Fungi*, razdeo *Ascomycota*, klasu *Sordariomycetes*, red *Hypocreales* i familiju *Nectriaceae* (Seifert i Lévesque, 2004).

Taksonomija roda *Fusarium* prošla je kroz niz promena tokom poslednjih 100 godina. (Ristić, 2012). Ovaj rod je dobio naziv na osnovu fuzoidnog (vretenastog) oblika makrokonidija koji je opisao Link 1809. godine. Rod *Fusarium* je veoma heterogen, obuhvata različite vrste u pogledu njihovih morfoloških svojstava. Klasični taksonomski sistemi bazirani su na morfološkim svojstvima kao što su oblik i veličina makrokonidija, prisustvo ili odsustvo mikrokonidija i hlamidospora, kao i struktura konidiofora. Makrokonidije sa bazalnom ćelijom u obliku stopala smatraju se stabilnom osobinom i čine osnovni kriterijum za klasifikaciju vrsta roda *Fusarium* (Ristić, 2012). One mogu biti različitih oblika i veličina. Dimenzije makrokonidija mogu da variraju u okviru pojedinačnih vrsta. Prisustvo ili odsustvo mikrokonidija i hlamidospora je ključno za taksonomiju *Fusarium* vrste (Nelson i sar., 1994).

Prema literaturi, najčešći prouzrokovani fuzariozne truleži na plodovima jabuka su: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. lateritium* i *F. solani*. Istraživanjima je utvrđeno da je *F. avenaceum*, vrsta koja je potencijalni proizvođač nekoliko mikotoksina, dominantan uzročnik fuzariozne truleži ploda jabuke nakon skladištenja. Visok procenat zaraze fuzarijone truleži može izazvati kontaminaciju sokova jabuke i ostalih proizvoda mikotoksinima, sekundarnim metabolitima vrsta *Fusarium* štetnih za ljudsko zdravlje (Sever i sar., 2012).

Najznačajniji toksini koje proizvodi *F. avenaceum* su moniliformin, akuminatopironi i hrizogini čije poznavanje je od velikog značaja za prerađivačku industriju jabuka (Kou i sar., 2014). Pored ovih mikotoksina, česti su i eniatine, hlamidisporol, 16-dimetiloktadekan-3-ol, aurofusarin i dr. (Sorensen i sar., 2009).

### 3.1.2.1. PREGLED STANJA UČESTALOSTI RODA *Fusarium* NA JABUKAMA U SVETU I KOD NAS

Bolesti jabuka koje prouzrokuju *Fusarium* vrste nedovoljno su ispitane. Tek nedavno su naučnici u Grčkoj ispitali uticaj *Fusarium* vrsta na propadanje plodova jabuka i došli do zaključka da je manji procenat jabuka bio zaražen ovom vrstom (smatra se da je za oko 3% jabuka uzročnik propadanja bio upravo *Fusarium*). Kao najznačajniji prouzrokovani bolesti jabuka iz roda *Fusarium* u Grčkoj spominju se vrste *F. avenaceum* i *F. proliferatum* (Sever i sar., 2012).

Tokom ispitivanja voćnjaka jabuka u Sloveniji u periodu između 2004. i 2006. godine, *Fusarium* vrste (posebno *F. avenaceum*) identifikovan je kao jedan od prouzrokovani bolesti jabuka (Sorensen i sar., 2009). U Južnoj Africi, veoma malo se zna o *Fusarium* vrstama kao potencijalnim prouzrokovani bolesti jabuka (Tewoldemedhin i sar., 2011), a u Tajvanu se tek 2003. godine javljaju prve ozbiljnije infekcije jabuka ovom vrstom gljive (Wang i sar., 2010).

Tokom sezona 2009. i 2010. godine, *Fusarium* rod je identifikovan na četiri sorte jabuka (Zlatni delišes, Jonagold, Ajdared i Pink Lady) u Hrvatskoj tokom čuvanja u Ultra Low Oxygen (ULO) uslovima. Tokom ovih istraživanja, *Fusarium* je detektovan na 9,4%-33,2% jabuka, u zavisnosti od sorte. Pored *F. avenaceum*, identifikovani su i vrste *F. crookwellense*, *F. semitectum*, *F. compactum*, i *F. pseudograminearum* (Sever i sar., 2012).

U skladištima u SAD prvi put je utvrđena tek 2014. godine (Kou i sar., 2014). U Velikoj Britaniji je prepoznat značaj *Fusarium* vrsta na jabukama te je 2012. godine sproveden monitoring i utvrđeno je da je dominantna vrsta *F. trincinctum*, a odmah posle nje *F. avenaceum* (Berrie, 2013).

### 3.1.2.2. SIMPTOMI *Fusarium* spp. NA PLODOVIMA JABUKE

*Fusarium* vrste uglavnom inficiraju jabuku preko lenticela, međutim infekcija ovom vrstom u velikom broju slučajeva nastaje na već oštećenim delovima jabuke. Fuzariozna trulež (slika 3.2., [www.mindenpictures.com/search/preview/a-storage-mould-fusarium-sp-on-stored-apple-fruit](http://www.mindenpictures.com/search/preview/a-storage-mould-fusarium-sp-on-stored-apple-fruit); Hokkanen i sar., 2015) javlja se na jabukama i drugom voću i tokom skladištenja. Manifestuje se u vidu braon, meke i vodenaste kružne nekroze koja vremenom postaje udubljena, ponekad sa gustom beličastom micelijom na površini ploda (Sever i sar., 2012).



Slika 3.2. Simptomi fuzariozne truleži na jabukama

### 3.1.2.3. IDENTIFIKACIJA *Fusarium* spp.

Identifikacija *Fusarium* vrsta zasniva se uglavnom na obliku i veličini makrokonidija i mikrokonidija, prisustvu ili odsustvu hlamidiospora kao i pigmentacije i brzine rasta na agaroznoj podlozi (Hafiz i sar., 2013). Na PDA podlozi, kolonije imaju promjenljivu morfologiju. Micelia može biti vazdušasta i zrakasta, razređena ili bogata a boja varira od bele, boje lososa do blede ljubičaste (Pérez-Vicente i sar., 2014). Makrokonidije gradi dve ili više ćelija i oblika su srpa. Mikrokonidije su izgrađene od jedne ili dve ćelije, a mogu biti uspravne ili krive. Hlamidiospore mogu biti prisutne ili odsutne ([http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/)).

Vrste roda *Fusarium* je veoma teško razlikovati međusobno na osnovu samo morfoloških i fizioloških karakteristika, zbog čega se u te svrhe koriste molekularne metode (92. Yli-Mattila i sar., 2002). Kao kod *Alternaria* vrsta i *Fusarium* vrste mogu biti identifikovane molekularnom metodom pomoću para univerzalnih ITS primera (ITS1/ITS4). Pored njih, molekularna identifikacija *Fusarium* vrsta može biti izvršena i sa drugim specifičnim prajmerima kao što su ef1/ef2, T1/T22, CL1/CL2A i MS1/MS2 (Ristić, 2012).

Prajmeri koji omogućavaju amplifikaciju gena značajnog za složeni mehanizam translacije proteina u ćelijama gljiva prilikom rasta i izduživanja ćelija su ef1 (ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) / ef2 (GGAAGTACCAAGTGATCATGTT). Ovi prajmeri umnožavaju segment DNK konačne dužine oko 700 bp. Par prajmera T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT) / T22 (TCTGGATGTTGTTGGGAATCC), omogućavaju amplifikaciju gena za  $\beta$ -tubulin do čije ekspresije dolazi tokom vegetativnog porasta kao i tokom klijanja konidija, a oni umnožavaju segmente DNK od oko 1300 bp. Amplifikaciju gena za calmodulin omogućava par prajmera CL1 (GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC)/CL2A (TTTTGCATCATGAGTTGGAC). Pozitivnom reakcijom smatra se pojava produkta očekivane veličine od 700-800 bp, dok par prajmera MS1 (CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG)/MS2 (GCGGATTATCGAATTAATAAC), omogućavaju amplifikaciju mitohondrijalne male podjedinice ribozomalne DNK. Veličina produkata koje se smatraju pozitivnom reakcijom za vrste roda *Fusarium* je od 716 bp (Ristić, 2012).

### 3.2. ANTAGONISTI SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

U zaštiti bilja dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava ili pesticida. Međutim, velika upotreba sintetičkih pesticida u savremenoj poljoprivredi uključujući i one koje se koriste za kontrolu fitopatogenih gljiva dovela je do nekoliko problema vezanih za zagađenje životne sredine i pojave rezistentnih sojeva. Takođe, međuprodukti njihove degradacije često su štetniji od polaznog jedinjenja, ostaju duže vreme u zemljištu ili podzemnim vodama, što može da ima velike posledice po čoveka. Zbog svega navedenog ogromni naponi su preduzeti za razvoj sigurne i efikasne strategije u kontroli ovih patogena, a poslednjih nekoliko godina u fokusu je potraga za alternativnim metodama koje mogu da smanje upotrebu toksičnih agrohemikalija (Grahovac i sar., 2009; Kumar i Chhatpar, 2011).

Biološko suzbijanje biljnih bolesti uglavnom obuhvata primenu komercijalnih bioloških preparata (biofungicidi) na bazi anantagonističkih mikroorganizama (bakterija, gljiva i dr.) ili produkata njihovog metabolizma, primenu biljnih ekstrakata i eteričnih ulja čiji se antagonizam s prouzrokovateljima biljnih bolesti ili biljnim patogenima temelji na interakcijama antibioze, kompeticije, parazitizma i indukovane otpornosti (Grahovac i sar., 2009; Miličević, 2014). Posebno je upotreba mikroorganizama u zaštiti voća od fitopatogenih gljiva dobila na značaju u poslednje dve decenije (Castoria i sar., 2008). Produkti metabolizma pomenutih mikroorganizama su toksini, kristali, spore i antibiotici, koji štite biljke delujući antagonistički na prouzrokovatelje bolesti, štetne insekte, nematode i korove, pri čemu su bezopasni za ljude i ekološki bezbedni (Grahovac i sar., 2009). Od velikog broja bakterija koje pokazuju antagonističko delovanje prema biljnim patogenima za komercijalnu primenu u biološkom suzbijanju danas se u svetu koriste vrste rodova: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pasteuria*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*. Svakako, najveću primenu u praksi imaju vrste i izolati bakterija iz rodova *Agrobacterium*, *Bacillus* i *Streptomyces* (Miličević, 2014). Pojedini mikroorganizmi proizvode i vitamine, enzime i biljne hormone koji ujedno mogu delovati na imuni sistem biljaka, povećavajući njihovu otpornost.

Međutim, smatra se da primena biopesticida u kontroli biljnih bolesti iziskuje više ljudskog rada i da su manje efikasni od hemijskih pesticida. Ipak, primena bioloških preparata ima i nekoliko prednosti nad hemijskim preparatima. Pre svega, organizmi za biološko suzbijanje predstavljaju prirodan izvor koji uzimamo iz prirode i nakon tretmana vraćamo u prirodu, čime ne remetimo ravnotežu i ne zagađujemo životnu sredinu. Takođe, primena bioloških agenasa u programima integralne zaštite bilja omogućava razvoj održive poljoprivredne proizvodnje a ujedno postoje visoke premije za proizvodnju i prodaju organskih proizvoda (bez ostataka pesticida). S obzirom da su bezbedni za upotrebu, njihovom primenom smanjujemo potrebu za hemijskim sredstvima. Ovi preparati pokazuju manji stepen fitotoksičnosti, kraćih su karenca i radnih karenca i njihova primena je dozvoljena u raznim tipovima biljne proizvodnje (organska, integralna itd.) (Grahovac i sar., 2009).

Biotehnološkim postupcima, korišćenjem različitih mikroorganizama kao proizvodnih, upotrebom sekundarnih metabolita istih, mogu se uspešno lečiti različite infekcije jabuka izazvane fitopatogenim gljivama. Zbog niske toksičnosti za čoveka i okolinu, a visokog stepena efikasnosti prema fitopatogenim gljivama, biotehnološka proizvodnja antifungalnih agenasa je u progresivnom porastu, s akcentom na *Streptomyces* vrste kao proizvodne mikroorganizme. Za tretiranje plodova jabuke posle berbe u Srbiji nema registrovanih preparata. Od bioloških preparata, u Srbiji je u jabuci registrovano dva preparata na bazi bakterije *Bacillus subtilis*, ali za primenu najkasnije 2-3 dana pre berbe plodova (Petrović i Sekulić, 2017). Kada govorimo o streptomicetama, u našoj zemlji nema registrovanih preparata na bazi ove bakterije, dok u svetu postoje komercijalno dostupni biofungicidi na bazi streptomiceta vrsta *S. lydicus* koji se uglavnom koristi za tretman povrća i ponekog voća, *S. griseoviridis* za tretiranje sadnica, lekovitog, ukrasnog bilja i povrća i *S. rimosus* (Pscheidt i Ocamb, 2013; Jicheng i sar., 2008).

Pored toga što se smatraju manje efikasnim u odnosu na hemijske preparate, biološki preparati imaju još potencijalnih nedostataka. Delovanje im je sporije u odnosu na hemijska sredstva, ovi preparati imaju uži spektar delovanja i teže se uvode u primenu. Takođe, biološki preparati zahtevaju višekratnu primenu, deluju uglavnom preventivno i mogu biti inkompatibilni sa drugim fungicidima ili baktericidima. Svakako, najozbiljniji nedostatak je cena njihove proizvodnje.

U cilju rešenja nedostataka bioloških preparata, nauka i brojni istraživački timovi širom sveta bave se problematikom razvoja proizvodnje bioloških preparata za zaštitu bilja. Većina istraživanja bavi se ispitivanjem potencijalnih mikroorganizama producera aktivnih komponenti, optimizacijom podloge i uslova proizvodnje kako bi se smanjili troškovi proizvodnje, a kvalitet proizvoda podigao na viši nivo.

Kada je reč o zaštiti jabuka primenom *Streptomyces* spp., u naučnoj literaturi nema puno dostupnih podataka na ovu temu. Živković i saradnici su 2010. godine ispitivali delovanje nekoliko različitih mikroorganizama na fitopatogene gljive roda *Colletotrichum*. Rezultati su pokazali da dva mikroorganizma iz roda *Streptomyces* pokazuju najbolji antagonistički efekat na rod *Colletotrichum* koji predstavlja jedan od najznačajnijih izazivača infekcija skladišnih patogena jabuke (Živković i sar., 2010). Na ovu fitopatogenu gljivu ispitivanja su radili i Prapagdee i saradnici koristeći *S. hygroscopicus* kao proizvodni mikroorganizam i došli do sličnih zaključaka (Prapagdee i sar., 2008). Iako su pojedini naučnici potvrdili izuzetan potencijal streptomiceta u kontroli fitopatogenih gljiva (Prapagdee i sar., 2008; Doumbou i sar., 2001; Shimizu i sar., 2009), istraživanja na temu ispitivanja potencijalnih producera agenasa za suzbijanje gljiva iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* kao potencijalnih prouzrokovaca bolesti jabuka, veoma su retka.

Zacky i Ting su 2013. godine ispitivali delovanje *Streptomyces griseus* na *F. oxysporum* dok su 2011. godine Gopalakrishnan i saradnici ispitivali delovanje čak 137 aktinomiceta na istu



gljivu (Zacky i Ting, 2013). Od svih aktinomiceta, *Streptomyces* vrste su pokazale najbolji antagonistički efekat na testiranu gljivu (Gopalakrishnan i sar., 2011). Priya i saradnici su 2014. godine takođe ispitivali delovanje *S. flavomacrosporus* na izolat roda *Fusarium* i još jednom potvrdili izuzetan potencijal ovog roda (Priya i sar., 2014). Kim i saradnici su u svojim istraživanjima ispitivali antifungalno delovanje čak 343 aktinomicete i potvrdili delovanje nekih od njih na gljive iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* (Kim i sar., 2013). S druge strane, Aghighi i saradnici su testirali delovanje *Streptomyces* sp. na nekoliko različitih fitopatogenih gljiva među kojima su jedna *Fusarium* i nekoliko *Alternaria* vrsta pri čemu su utvrdili da ova bakterija pokazuje širok spektar antifungalne aktivnosti (Aghighi i sar., 2004). Svakako, *Streptomyces* vrste su pokazale izuzetan potencijal kada je reč o antifungalnom delovanju.

Formulacija bioloških preparata zahteva veoma dobro poznavanje interakcije mikroorganizama i objekta suzbijanja. Osnovno je da se preparati mogu proizvoditi na tečnom ili polučvrstom supstratu i u dovoljnim količinama, zatim da ostaju vitalni tokom čuvanja i posle primene preparata, da pod selekcionim pritiskom u laboratorijskim uslovima ne izgube osobine važne za biološko suzbijanje (varijabilnost, vitalnost, selektivnost), kao i kompatibilnost sa tehnologijom primene. Ovo se prevazilazi korišćenjem stikera ili hranljivih i vezivnih materija i nosača kao značajnog dela u formulaciji finalnog proizvoda.

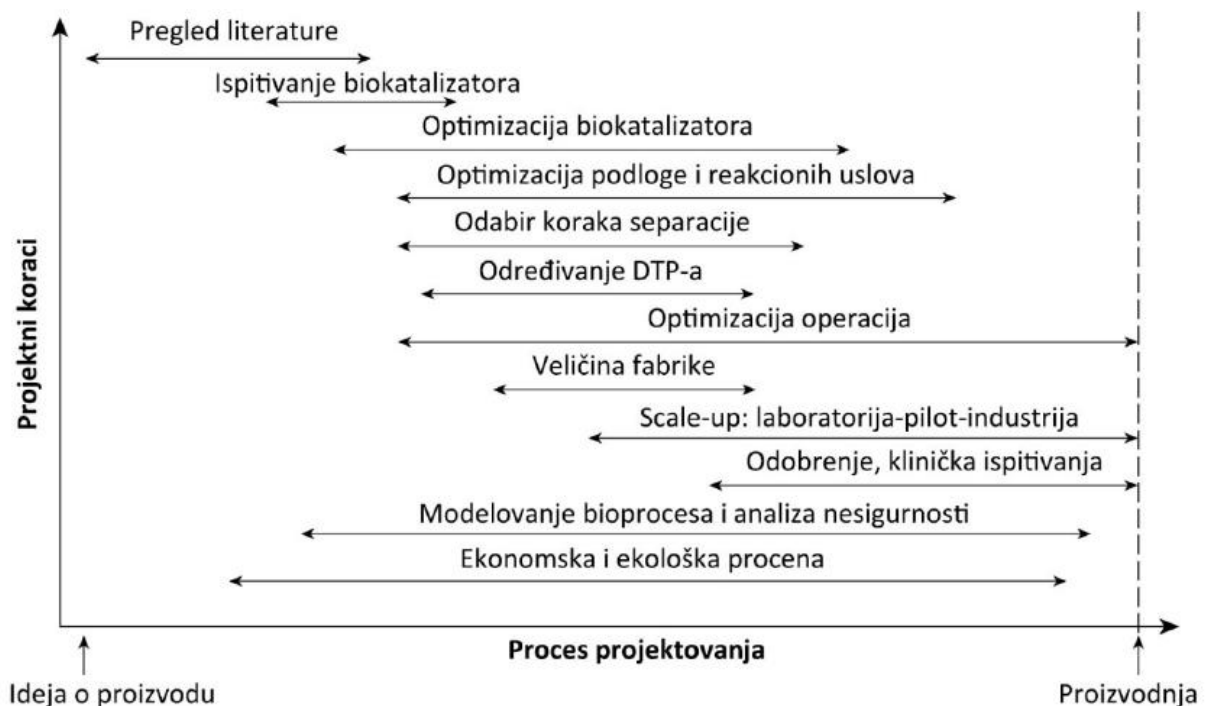
Razvoj nauke i napredak u mikrobiološkim, biohemijskim i molekularnim istraživanjima doveli su do stvaranja nove generacije proizvoda – biofungicida. Svakako da će situacija na tržištu, uključujući i stav samog potrošača ali i industrije da prihvate nove tehnologije, u većoj meri uticati na razvoj i implementaciju ekološki prihvatljivih metoda u borbi protiv fitopatogenih gljiva (Castoria i sar., 2008). U našoj zemlji ovaj segment zaštite bilja je na samom početku i potrebno je raditi na ispitivanju i uvođenju ovih preparata u našim agroekološkim uslovima.

### **3.3. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE**

Razvoj proizvodnog postupka obuhvata nekoliko koraka (slika 3.3.) pri čemu svaki od njih ne funkcioniše zasebno već u svakom trenutku nekoliko koraka rade paralelno i međusobno komuniciraju. Svakako, krajnji cilj razvoja svakog proizvodnog postupka je dobijanje željenog proizvoda koji treba da je jasno definisan, odgovarajućeg kvaliteta, čistoće i dr. Nakon definisanja proizvoda, neophodno je detaljno pregledati dostupnu literaturu i patente. Ovim se dobijaju potrebne informacije o tome da li već postoji neki sličan proizvod na tržištu ili u procesu razvoja. Pregled literature može značajno da pomogne u potrazi za odgovarajućim biokatalizatorom, bioprocenom i operacijama za dobijanje i prečišćavanje proizvoda (Heinzle i sar., 2006).

Ključnu ulogu u bioprocima igra biokatalizator. Nakon što se izvrši odabir biokatalizatora neophodno je da se izvrši njegova optimizacija sa ciljem postizanja ekonomski isplativog prinosa i koncentracije proizvoda. Ovde pored klasičnih metoda poboljšanja vrste ključnu ulogu igra i genetičko inženjerstvo. Paralelno sa optimizacijom biokatalizatora neophodno je izvršiti optimizaciju podloge za kultivaciju kao i procesnih uslova pod kojima će učinak biokatalizatora biti najbolji. Podloga treba da bude jednostavna i što je moguće jeftinija, ali da omogući optimalni rad biokatalizatora u pogledu njegovog rasta i formiranja proizvoda. U okviru optimizacije podloge za kultivaciju, mogu se ispitati različite komponente i njihove koncentracije, poput upotrebe različitih izvora ugljenika i azota. Štaviše, na odabir komponenti hranljive podloge treba obratiti posebnu pažnju zbog kasnijeg postupka izdvajanja i prečišćavanja proizvoda.

Odabir optimalnih reakcionih uslova takođe je značajan korak u razvoju proizvodnog postupka jer treba da obezbede najbolje okruženje (vrednost pH, temperatura, pritisak, kiseonik itd.) za biokatalizator i homogenost u bioreaktoru. Uglavnom je geometrija bioreaktora unapred data, dok se operativni uslovi mogu menjati. Neophodno je, pre svega, podesiti uslove mešanja i intenzitet aeracije bez obzira da li se ona vrši pomoću vazduha, čistog kiseonika, ugljenik(IV)-oksida ili vazduha obogaćenog kiseonikom itd. Profili dovođenja ovih gasova mora se optimizovati radi optimalnog učinka (Heinze i sar., 2006).



Slika 3.3. Koraci u razvoju bioprocisa. Dijagram toka procesa (DTP)

Na kraju bioprocisa potrebno je odabrati odgovarajuće korake za izdvajanje i prečišćavanje dobijenog proizvoda i sastaviti dijagram toka procesa (DTP) koji povezuje sve *upstream* (priprema hranljive podloge, sterilizacija i bioprocis) i *downstream* (izdvajanje i

prečišćavanje proizvoda) procese. U postupku separacije koriste se različite operacije čija je optimizacija takođe neophodna kako bi se postigla najbolja efikasnost. Svaki korak se optimizuje ka krajnjem cilju, odnosno maksimalnom ukupnom prinosu proizvoda.

Prilikom planiranja povećanja razmera bioprocesa (engl. *scale up*) određuje se veličina postrojenja. Veličina tržišta procenjena na početku procesa projektovanja proverava se u ovoj fazi. Vreme trajanja bioprocesa, prinos separacije i očekivana koncentracija proizvoda koriste se za procenu neophodne veličine i broja bioreaktora. Postupak povećanja razmera počinje u laboratorijskim uslovima koji podrazumevaju nivo erlenmajera i nivo laboratorijskog bioreaktora (zapremine do 5 l), preko pilot postrojenja do industrijskih razmera. Pilot postrojenje daje prve uzorke za tržište ili, u slučaju farmaceutskih proizvoda, broj potrebnih kliničkih ispitivanja (Heinzle i sar., 2006).

Kada su dostupni prvi podaci o bioprocusu, oni se mogu iskoristiti za njegovo modelovanje, radi proračuna materijalnih bilansa, potrošnje energije, potreba radne snage i opreme za proizvodni proces. Još od ranih faza razvoja, eksperimentalni i rezultati modelovanja koriste se za analizu ekonomskih i ekoloških aspekata, kako bi se realizovao održiv bioprocus. Svi koraci u razvoju bioprocesa kao i sam bioprocus moraju biti dokumentovani do detalja što pomaže u donošenju daljih odluka. Opis bioprocesa je neophodan za izgradnju proizvodnog postrojenja, ocenu bioprocesa, i često za odobrenje proizvoda (Heinzle i sar., 2006).

Sposobnost sinteze antimikrobnih metabolita je veoma rasprostranjena u svetu mikroorganizama. Uspešnost njihove industrijske proizvodnje najviše zavisi od karakteristika proizvodnog mikroorganizma, međutim značajan uticaj ima i sastav podloge i procesni uslovi kultivacije. Proces biosinteze različitih antimikrobnih komponenti odlikuje se specifičnim karakteristikama za svaku pojedinu komponentu. Ipak, primena osnovnih principa biotehnološke proizvodnje preduslov je za željeni kvalitet biosintetisanih metabolita. Uspešno vođenje biotehnološkog procesa i postizanje visokih prinosa osigurava se optimizacijom uslova kultivacije: pravilnim izborom sastojaka i optimizacijom njihove koncentracije u hranljivoj podlozi, osiguranjem rasta čiste kulture mikroorganizama bez kontaminacije, snabdevanjem kulture dovoljnim količinama kiseonika, održavanjem potrebne temperature i vrednosti pH tokom kultivacije i sprečavanjem intenzivnog penjenja podloge (Pejin, 2003). S druge strane, u cilju poboljšanja ekonomičnosti postupka proizvodnje koriste se hranljive podloge u čiji sastav ulaze jeftinije sirovine koje su ujedno i lako dostupni ili predstavljaju otpadne efluente drugih industrija.

S obzirom da se u svetu spominje svega nekoliko komercijalno dostupnih biofungicida na bazi streptomiceta (*S. lydicus*, *S. griseoviridis* i *S. rimosus*), podaci o industrijskoj proizvodnji antifungalnih metabolita vrlo su retki i ukoliko su rađeni, uglavnom su patentom zaštićena ili predstavljaju proizvođačku tajnu. Svi dostupni naučni podaci uglavnom se bave ispitivanjima u malim zapreminama koja se odnose na odabir proizvodnog mikroorganizma

i optimizaciju podloge (uglavnom sintetičke) za proizvodnju željenih metabolita. Međutim, istraživanja o uslovima proizvodnje u laboratorijskom bioreaktoru koja se pre svega odnose na optimizaciju procesnih parametara, praktično i da nema.

### 3.3.1. PROIZVODNI MIKROORGANIZAM

Pod biološkim katalizatorima podrazumevaju se biološke vrste i njihovi proizvodi ili delovi koji imaju sposobnost konverzije supstrata (sirovine) u korisne proizvode. U biotehnološkoj proizvodnji kao bikatalizatori, mogu da se koriste mikrobne, animalne, biljne ćelije, tkiva i enzimi. Dakle, klasifikacija biokatalizatora može da se izvrši i prema tome da li vrše enzimске biotransformacije ili metaboličke biokonverzije (Heinzle i sar., 2006; Baras i sar., 2009).

Rečenica „mikroorganizmi su veoma mali, ali im je moć veoma velika“ na pravi način iskazuje potrebu da se toj biološkoj vrsti posveti najveća moguća pažnja. Broj opšte korisnih mikroorganizama nije veliki, a još ih je manje korisnih za industrijsku proizvodnju. Zato je, među brojnim nekorisnim, pa i štetnim mikroorganizmima, potrebno identifikovati korisne, zatim ih izdvojiti iz prirodnih staništa (izolovati), izučiti njihova svojstva i odrediti uslove za njihovo optimalno gajenje radi korišćenja u industrijskoj proizvodnji (Baras i sar., 2009).

#### 3.3.1.1. ROD *Streptomyces* KAO PROIZVODNI MIKROORGANIZAM

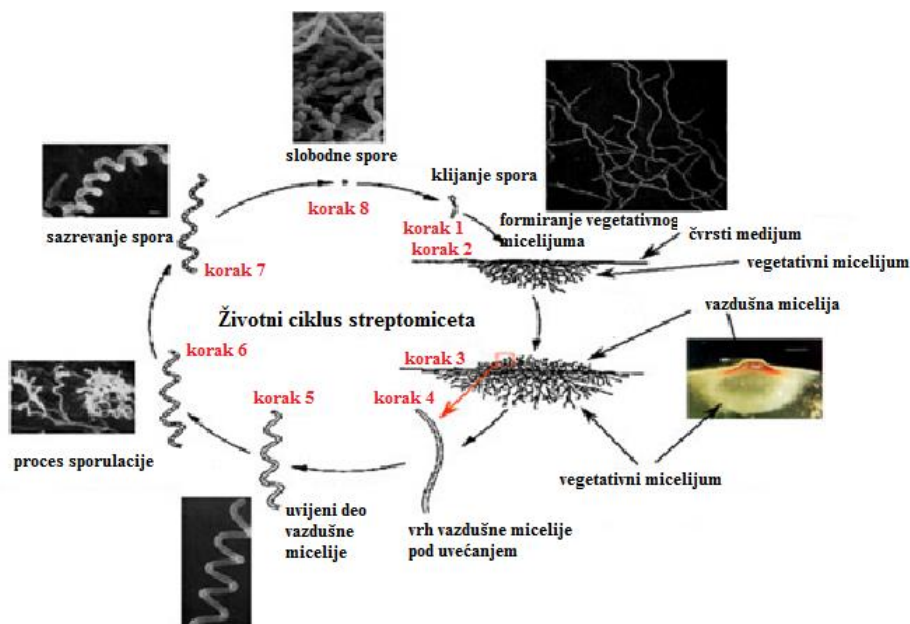
U industrijskoj proizvodnji visokovrednih proizvoda centralna uloga pripada upravo proizvodnom mikroorganizmu. U skladu sa ovim, prvi korak u biotehnološkoj proizvodnji je odabir proizvodnog mikroorganizma. Proizvodni soj treba da ima visoku sposobnost proizvodnje i stabilne tehnološke osobine potrebne za proizvodnju. U cilju pronalaženja mikroorganizma sa navedenim karakteristikama, naučnici širom sveta usmereni su ka izolaciji sojeva iz prirodnog okruženja i njihovom unapređenju različitim tehnikama. Najveći broj producenata antimikrobnih komponenti pripada rodu *Streptomyces*. Streptomicete su prokariotske, gram-pozitivne, aerobne, sporogene, filamentozne bakterije sa velikim biotehnološkim potencijalom (Birch i sar., 1990). Rod *Streptomyces*, pripada familiji *Streptomicetae*, redu *Actinomycetae* i klasi *Actinobacteria*. Proizvođači su velikog broja aktivnih jedinjenja veoma različitih hemijskih struktura, a po ovoj sposobnosti posebno se izdvajaju rod *Streptomyces* iz familije *Streptomycetaceae* i ne tako davno otkriveni, rod *Salinispora* iz familije *Micromonosporaceae* (Mincer i sar., 2002).

Rod *Streptomyces* razvio se pre 450 miliona godina kao jedan od prvih saprofitnih rodova bakterija. Eksploatacija bakterija ovog roda počela je 40-ih godina XX veka (Wallace i sar., 1945; Carter i sar., 1948) a traje i danas. Ovaj rod trenutno sadrži najveći broj opisanih vrsta, 576 vrsta do 2010. godine (Labeda, 2011), odnosno po drugim izvorima preko 900 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>) koji se uvećava svake godine. Unutar roda *Streptomyces*, vrste se klasifikuju po različitim kriterijumima: fiziološkim (proizvodnja

primarnih i sekundarnih metabolita, korišćenje različitih izvora ugljenika i azota), morfološkim (boja i oblik micelija i spora) i genetičkim (Williams i sar., 1983).

Ove bakterije su vrlo rasprostranjene u prirodi. Njihova najznačajnija staništa su zemljište bogato organskim materijama i travnata vegetacija. Međutim, one žive i u zemljištu zagađenom ugljovodonicima, teškim metalima kao i u vodi (Pejin, 2003). Takođe pripadnici ovog roda mogu nastanjivati različite ekološke oblasti od umerenih (temperaturni optimum od 25-35°C, optimum pH opsega između 6,5-8,0) (Holt i sar., 1994) do ekstremnih kao što su sedimenti dubokih voda (Pathom-Aree i sar., 2006; Tian i sar., 2012), alkalna zemljišta (Antony-Babu i Goodfellow, 2008), oblasti niskih (Li i sar., 2002) ili visokih (James i sar., 1991) temperatura. Većina streptomiceta proizvodi spore i živi u zemljištu kome daje karakterističan miris koji potiče od isparljivog metabolita geosmina. Uglavnom su bezopasne po ljude, životinje i biljke, mada ima i patogenih vrsta, i to pretežno biljnih patogena.

Streptomicete su bakterije kompleksne morfologije i životnog ciklusa. Životni ciklus streptomiceta, kao i njihova struktura, sličan je kao kod gljiva (slika 3.4., <http://www.tuat.ac.jp/~chemreg/Eng/bioregchem.html>). Tokom vegetativne faze razvoja, replikacija DNA odvija se bez ćelijske deobe, stvarajući prvo hife prečnika 0,5-2,0 μm koje formiraju izrazito razgranatu miceliju podeljenu na fragmente. Vazdušne hife rastu u vazduhu iznad površine kolonije dok supstratne hife rastu u podlozi (Anderson i Wellington, 2001). Od micelijuma odnosno hifa nakon metamorfoze, obrazuju se spore pomoću kojih se streptomicete razmnožavaju i rasipaju.



Slika 3.4. Životni ciklus streptomiceta

Kolonije su uglavnom glatke površine, ali se kasnije razvijaju u vazdušasti micelijum koji može biti flokulast, granulast, puderast ili baršunast, zbog čega često izgledaju smežurano

ili lišajasto. Micelijum je često pigmentisan ([www.microbiologybytes.com](http://www.microbiologybytes.com)). Na formiranje ove taksonomski važne karakteristike utiču različiti faktori među kojima su sastav hranjive podloge, temperatura kao i prisustvo specifičnih supstanci koje mogu imati stimulatorni efekat.

Tokom kultivacije morfologija ovih organizama, u zavisnosti od stepena agregacije, varira od slobodno suspendovanih filamenata do peleta. Pelete u submerznoj kultivaciji nastaju kao rezultat agregacije spora i/ili hifa. Agregacija između samih spora ili elemenata hifa može biti blokirana sastavom, strukturom, hidrofobnošću ili naelektrisanjem ćelijskog zida, kao i prisustvom brojnih polimernih supstanci. Favorizovana forma za produkciju metabolita je forma veoma malih peleta, a ona se postiže dodatkom raznih aditiva kao što je karboksimetilceluloza (CMC), povećanjem veličine inokuluma, promenom vrednosti pH podloge i dr. (Ilić i sar., 2014).

Upravo zbog složenog životnog ciklusa, taksonomski položaj streptomiceta dugo nije bio jasno određen. Mikolozi su ih zbog micelijskog oblika rasta smatrali zrakastim plesnima a bakteriolozi bakterijama. Danas su zbog svoje tipične prokariotske strukture prihvaćene kao bakterije. Za klasifikaciju streptomiceta najčešće se upotrebljava Bergey-ev sistem koji u obzir uzima kriterijume Međunarodnog projekta za klasifikaciju streptomiceta, ISP (engl. International Streptomyces Project) (Borovička, 2012).

### 3.3.1.2. ROD *Streptomyces* KAO PROIZVOĐAČ SEKUNDARNIH METABOLITA

Većina organizama iz razdela bakterija, gljiva i biljaka poseduje tačno definisane biohemijske puteve koji nisu direktno uključeni u rast, razviće ili reprodukciju te nisu u direktnoj vezi sa održavanjem životnih funkcija. Ovi putevi svrstavaju se pod zajednički naziv sekundarni metabolizam. Sekundarni metabolizam je odgovaran za proizvodnju raznih neesencijalnih organskih molekula koje se sintetišu u stacionarnoj fazi rasta (Berdy, 2005). Najnovija istraživanja sugerišu da je uloga sekundarnih metabolita pre svega u komunikaciji organizma sa dugim organizmima sa kojima stupaju u simbiotske, komensalne ili kompetitivne odnose (Bibb, 2005; Dufour i Rao, 2011). Naučne studije pokazale su da preko 5% genoma streptomiceta zauzimaju geni zaduženi za sintezu sekundarnih metabolita (Nett i sar., 2009). Zahvaljujući kompleksnom sekundarnom metabolizmu sposobne su da metabolišu različita jedinjenja, uključujući šećere, alkohole, aminokiseline i aromatična jedinjenja pomoću ekstracelularnih hidrolitičkih enzima (Elibol, 2004).

Za sintezu sekundarnih metabolita streptomicete koriste posebne metaboličke puteve koji se aktiviraju u uslovima morfološke diferencijacije i sporulacije i nisu esencijalni za život ćelije. Vrlo često su prekursori sekundarnog metabolizma isti i u putevima primarnog metabolizma ili predstavljaju derivate primarnih metabolita. Proizvodnja sekundarnih

metabolita kod streptomiceta najčešće je u korelaciji sa promenama morfologije kolonije, formiranjem vazdušnog micelijuma i sporulacijom. Početna faza kod oba procesa nastaje tokom kasne faze rasta što se poklapa sa usporavanjem eksponencijalnog rasta organizama. Proučavanje proizvoda sekundarnog metabolizma dovelo je do otkrića bioaktivnih molekula koji su našli svoju primenu u poljoprivredi i medicine (Stanković, 2012).

Tabela 3.1. Broj prirodnih produkata izolovanih iz tri grupe mikroorganizama do 2002. godine

Producenti	Antibiotici	Drugi produkti*	Ukupno
Aktinomicete	8700	1400	10100
Ostale bakterije	2900	900	3800
Gljive	4900	3700	8600
Ukupno	16500	6000	22500

\*Obuhvataju antimikotike, antitumorske agense, herbicide, imunosupresive

Preko 10000 jedinjenja proizvedeni su pomoću aktinomiceta, a od toga 7600 jedinjenja proizvedeni su koristeći *Streptomyces* vrste (Olano i sar., 2008). Svakako, najvažniji sekundarni metaboliti streptomiceta su antibiotici. Oko 50% komercijalno važnih prirodnih antibiotika koji se primenjuju u humanoj medicini, agronomiji i veterini potiče od streptomiceta (tabela 3.1.) (Hopwood i sar., 1995). Pored antibiotika koji su prvi otkriveni i uvedeni u kliničku praksu, produkti roda *Streptomyces* deluju i kao antitumorski agensi (mitomicin, adriamicin i bleomicin koji inhibiraju replikaciju DNK), antimikotici (kandacidin i nistatin koji narušavaju kontinuitet membrane), antihelmintici, insekticidi, pesticidi (Firn i Jones, 2000; Kumari i sar., 2006; Hopwood, 2007). Svaka vrsta roda *Streptomyces* sposobna je da sintetiše više od jednog sekundarnog metabolita. Tako na primer, vrsta *S. coelicolor* sposobna je da sintetiše najmanje 4 antibiotika: aktinorodin, undecilprodigiosin, metilenomicin i lipopeptidni antibiotik CDA (Diminić, 2007).

Poboljšanje karakteristika proizvodnog mikroorganizma vrši se izolovanjem i selekcijom novih proizvodnih sojeva i njihovim oplemenjavanjem klasičnim laboratorijskim tehnikama i tehnikama genetičkog ili metaboličkog inženjerstva (Mojović, 2008). Cilj ovih tehnika je izazivanje promena u samom mikroorganizmu čime se postiže poboljšanje kvaliteta i kvantiteta željenog proizvoda, skraćuje se proces proizvodnje, vrši se prilagođavanje mikroorganizma jeftinijim supstratima, a sve to značajno utiče na ekonomičnost bioprocasa.

### 3.3.2. HRANLJIVE PODLOGE

Aktivnost mikroorganizama u velikoj meri zavisi od uslova sredine u kojoj borave. To su, pre svega hranljive podloge u kojima mikroorganizmi rastu, razmnožavaju se i proizvode željene komponente. Hranljive podloge moraju da sadrže supstrate u obliku koji mikroorganizmi najbolje usvajaju. Obično je to rastvor supstrata u vodi. U laboratorijskim

uslovima se, po pravilu, upotrebljavaju sintetičke hranljive podloge, sastavljene iz čistih jedinjenja jer su nezamenljive kada se razmatra uticaj pojedinih supstanci i elemenata na fiziologiju mikroorganizama koji rastu na njima (Popov, 2000).

Proizvodnom mikroorganizmu je potrebna odgovarajuća koncentracija supstrata, pre svega izvora ugljenika i azota, za metabolizam tokom rasta i biosinteze. Ugljenik i azot su potrebni za sintezu ćelija mikroorganizma, ali i kao izvor energije. Međutim, različite streptomicete različito usvajaju pojedine nutrijente. Takođe, pojedini nutrijenti pokazuju bolji uticaj na rast i umnožavanje streptomiceta, dok drugi podspešuju proizvodnju sekundarnih metabolita.

Kao izvor ugljenika, streptomicete mogu da usvajaju monosaharide, oligosaharide, polisaharide, alkohole i organske kiseline (Kojima i sar., 1995). Podloge koje kao izvora ugljenika sadrže skrob, laktozu, glicerol, maltozu, saharozu ili fruktozu mogu rezultovati smanjenjem rasta mikroorganizama sa niskim prinosom biomase ali vrlo često povećanim prinosom proizvoda (Brzonkalik i sar., 2011), dok izvori ugljenika koji se brzo metabolišu, poput glukoze, često dovode do maksimalne stope rasta biomase, ali često smanjenja proizvodnje nekih sekundarnih metabolita (Gallo i Katz, 1972). Takođe, optimalan izvor ugljenika nije isti za sve streptomicete i varira među mnogim proizvodno sposobnim streptomicetama (Jonsbu i sar., 2002). Utvrđeno je da *S. hygroscopicus* najbolje usvaja glicerol, manozu, trehalozu, manitol (Tresner i Backus, 1956). S druge strane, skrob, rafinoza, celobioza, fruktoza, arabinoza su pokazali dobar uticaj na rast biomase ćelija *S. hygroscopicus* dok su se glicerol, fruktoza, manozu i skrob pokazali kao najbolji kod produkcije sekundarnih metabolita (Kim i sar., 2014; Tresner i Backus, 1956; Gesheva sar., 2005). Glicerol se u naučnoj literaturi spominje kao značajan nutrijent za produkciju antifungalnih metabolita primenom *Streptomyces capoamus* (Singh i sar., 2008). Takođe, neki naučnici navode da se maksimalna produkcija antimikotika postiže kada se glicerol koristi kao izvor ugljenika u podlozi za kultivaciju *Streptomyces rimosus* (Singh i Rai, 2012). Što se tiče kompleksnijih izvora ugljenika, mikroorganizmi ih prethodno razaraju na male molekule a zatim ih pretvaraju u aminokiseline, nukleotide, vitamine, ugljene hidrate i masne kiseline, i konačno grade proteine, koenzime, nukleinske kiseline, polisaharide i lipide. Za razliku od njih, u industrijskim biotehnološkim postupcima uglavnom se koriste podloge koje se pripremaju od jeftinih prirodnih sirovina biljnog ili životinjskog porekla, prirodne (kompleksne) hranljive podloge, a često se pripremaju i od otpadnih tokova iz nekih drugih grana industrije (Popov, 2000).

Kao izvor azota, za rast i umnožavanje streptomiceta ali i za produkciju sekundarnih metabolita koriste se organski izvori ili neorganske soli. Alanin, asparaginska kiselina, histidin, glutamin i glicin predstavljaju najpogodnije aminokiseline koje *S. hygroscopicus* može da usvaja (Tresner i Backus, 1956). Međutim, aminokiseline predstavljaju skup izvor azota u podlogama pa njihova upotreba nije opravdana kada se radi sa većim zapreminama podloge. Zbog svega navedenog u praksi su više zastupljeni drugi organski i neorganski



izvori azota. Kao najznačajniji organski izvor azota kod proizvodnje antifungalnih metabolita, spominje se sojino brašno (Singh i sar., 2009). Ono u svom sastavu sadrži veliki broj aminokiselina, među kojima su najznačajniji asparagin, glutamin, leucin, arginin, lizin i serin, pa se može pretpostaviti da su neke od ovih kiselina ključni donori azota za biosintezu antifungalni jedinjenja (Tadijan i sar., 2016). Od organskih izvora azota pored sojinog brašna, streptomicete dobro usvajaju pepton i ekstrakt kvasca (Ripa i sar., 2009; Ortiz i sar., 2007), dok se od neorganskih izvora azota u naučnoj literaturi najviše spominje upotreba amonijumovih soli.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se pokazao kao dobar izvor azota za rast biomase ali i produkciju željenog proizvoda mikroorganizama *S. hygrosopicus*, dok su  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  i  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pokazali nešto slabiji efekat (Lee i sar., 1997).

Fosfor je takođe uključen u procese biosinteze i ključni je element u regulaciji ćelijskog metabolizma. Fosfor se u ćelijama mikroorganizama nalazi u obliku fosfata i to najčešće u nukleotidima i nukleinskim kiselinama. Ova jedinjenja ulaze u važne sastavne delove ćelija, kao što su DNK, RNK i ATP. Interesantno je da neorganski fosfati u podlozi kontrolišu sintezu velikog broja sekundarnih metabolita koji pripadaju različitim biosintetičkim grupama. Brojne naučne studije opisuju negativan efekat visokih koncentracija fosfata na produkciju različitih sekundarnih metabolita (Martin, 2004). Svakako, pojedinim istraživanjima utvrđeno je da  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pokazuje pozitivan efekat na produkciju sekundarnih metabolita kod streptomiceta (Ripa i sar., 2009).

Magnezijum, sumpor i kalijum takođe predstavljaju važne elemente podloge. Sumpor igra značajnu ulogu u strukturi ćelija mikroorganizama obzirom na to da ulazi u sastav aminokiselina cistina, cisteina i metionina, a ima ulogu i u stimulaciji proteolitičkih enzima. Uglavnom se u podlozi nalazi u obliku sulfata (Pejin, 2003). Kalijum predstavlja kofaktor za mnoge enzime i neophodan je u metabolizmu ugljenih hidrata. Najčešće se kao izvori kalijuma koriste  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{K}_3\text{PO}_4$ . Magnezijum je aktivator velikog broja enzima i neophodan je u procesima oksidacije. Prisustvo  $\text{Mg}^{2+}$  jona je posebno potrebno u ribozomima, a obično se u podlogu dodaje kao  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ili kao  $\text{MgCl}_2$  (Mojović, 2008).

Razvoj tehnološkog postupka proizvodnje antifungalnih agensa tj. biofungicida je važan korak ka njihovoj komercijalnoj upotrebi, a jedan od limitirajućih i veoma bitnih faktora svake proizvodnje je svakako njena cena (Ismet i sar., 2012). Kako bi se uticalo na ovaj segment, u biotehnološkoj proizvodnji antifungalnih agenasa, sve više se koriste medijumi koji u svojoj osnovi sadrže otpadne tokove različitih grana industrije, poljoprivredni otpad i nusproizvode iz prehrambene i drugih industrija (Nunes, 2012). Cilj njihove upotrebe je svakako smanjenje troškova proizvodnje ali i smanjenje njihovog nakupljanja u životnoj sredini što predstavlja jedno od rešenja ovog značajnog ekološkog problema.

S obzirom da je izvor ugljenika jedan od najzastupljenijih nutrijenata podloge, sve više pažnje se posvećuje pronalaženju odgovarajućih otpada koji bi potencijalno mogli da zamene standardne izvore ugljenika i time značajno doprinesu ekonomičnosti bioprocasa. U skladu sa ovim, glicerol koji nastaje kao nusproizvod u proizvodnji biodizela predstavlja

obećavajući izvor ugljenika u podlozi za proizvodnju antifungalnih metabolita primenom *Streptomyces* spp. (Cawoy i sar., 2011). Eukarioti i neki prokarioti imaju sposobnost da asimiluju otpadni glicerol i konvertuju ga u neki visokovredan proizvod jer kao i drugi mali molekuli, i glicerol može da prođe kroz citoplazmatsku membranu u ćelijama putem pasivne difuzije (Aggelis, 2009; da Silva i sar., 2009). Ovako dobijen sirovi glicerol može biti značajan izvor ugljenika u mnogim mikrobiološkim procesima zbog niske cene, a već smo spomenuli da je on jedan od izvora ugljenika izbora kada govorimo o umnožavanju i produkciji antifungalnih metabolita pomoću mikroorganizma *Streptomyces hygroscopicus* (Kim i sar., 2014; Tresner i Backus, 1956; Gesheva sar., 2005).

### 3.3.3. PROCESNI USLOVI

Metabolička aktivnost selekcionisanog proizvodnog mikroorganizma na podlozi optimalnog sastava u značajnoj meri zavisi i od uslova sredine kakvi su vrednost pH i sadržaj kiseonika u podlozi za kultivaciju, temperatura i pritisak pri kojima se odvija proces. Stabilan bioproces sa predvidivim ishodom odvija se uz odgovarajuću homogenizaciju kultivacionog medijuma u sterilnim uslovima. I na laboratorijskom nivou procesni uslovi moraju biti precizno definisani i kontrolisani, a u industrijskim razmerama održavanje njihove vrednosti u optimalnim granicama je osnova za uspešnost svakog mikrobiološkog procesa (Dodić i Grahovac, 2013).

Uspešno vođenje biotehnološkog procesa i postizanje visokih prinosa željenih komponenti osigurava se pravilnim izborom sastojaka i optimizacijom njihove koncentracije u hranljivoj podlozi, osiguranjem rasta čiste kulture mikroorganizama bez kontaminacije drugim mikroorganizmima, održavanjem potrebne temperature i vrednosti pH tokom kultivacije, sprečavanjem intenzivnog penjenja podloge i snabdevanjem kulture dovoljnim količinama kiseonika.

#### 3.3.3.1. TEMPERATURA

Temperatura je jedan od najvažnijih parametara koji utiče na rast mikroorganizama. Optimalna temperatura je temperature pri kojoj se ćelije najbrže razmnožavaju, rastu i proizvode odgovarajuće metabolite. Za produkciju visokovrednih metabolita koje proizvode streptomicete, optimalna temperature kreće se u intervalu od 27°C do 30°C. Međutim, neki pripadnici ovog roda mogu nastanjivati oblasti sa temperaturom do 35°C pa i ekstremne oblasti sa veoma visokim temperaturama (James i sar., 1991). Svakako, za produkciju sekundarnih metabolita primenom *S. hygroscopicus*, u literature se najčešće spominje temperatura  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  (Yen i Li, 2014; Yen i Hsiao, 2013). Za proizvodnju antifungalnih metabolita, kultivacija se obično od početka do kraja bioprocasa vrši pri konstantnoj temperaturi.

### 3.3.3.2. VREDNOST pH

Za biosintezu većine antifungalnih metabolita pomoću streptomiceta, optimalna vrednost pH je blizu neutralnog područja. S druge strane, mnogi antifungalni agensi su nestabilni i brzo se inaktiviraju u baznim ili kiselim uslovima (hranljivim podlogama). Vrednost pH se tokom kultivacije i biosinteze mnogih antifungalnih agenasa menja, a regulisanje se postiže sastojcima u hranljivim podlogama kao što je  $\text{CaCO}_3$  ili automatskom regulacijom dodatkom kiseline ili baze u hranljivu podlogu sa preciznošću od 0,1 pH jedinice (Mojović, 2008). Za rast i produkciju *S. hygroscopicus*, smatra se da su vrednosti pH oko optimalnog (vrednost pH između 6 i 8) najpogodniji (Yen i sar., 2013).

### 3.3.3.3. OSMOTSKI PRITISAK

Koncentracija soli u podlozi za proizvodnju antifungalnih metabolita primenom streptomiceta ima veliki uticaj na osmotski pritisak podloge a samim tim i na produkciju željenih komponenti. Međutim, relativno malo informacija o osmoregulatornoj strategiji aktinomiceta je dostupno u literaturi. Smatra se da streptomicete izolovane iz suvih i slanah zemljišta tolerišu nivo NaCl do čak 13% u podlozi (Subramaniam i sar., 2016). Istraživanja su pokazala da su različite streptomicete u različitoj meri tolerantne na NaCl (Tresner i Backus, 1956). Podaci iz naučno dostupne literature pokazuju da se koncentracije soli do 0,5% u podlozi za kultivaciju streptomiceta smatra optimalnom, da bi se daljim povećanjem proizvodnja znatno smanjila (Siddique i sar., 2014). Druga istraživanja su takođe potvrdila da je koncentracija između 0,5 % i 1% NaCl u podlozi najbolja za produkciju sekundarnih metabolita primenom streptomiceta (Ripa i sar., 2009).

### 3.3.3.4. STERILNOST

Uspešnost biotehnoške proizvodnje veoma zavisi od sterilnosti. Bez obzira da li govorimo o laboratorijskim ili industrijskim uslovima proizvodnje, podloga, vazduh za aeraciju, sud u kome se odvija bioproces, sve komponenti koje se tokom bioprocasa naknadno dodaju, moraju biti lišene vegetativnih oblika i/ili spora mikroorganizama kontaminanata. Danas postoje različiti postupci kojima se postiže eliminacija potencijalno prisutnih kontaminanata. Uspešno sproveden postupak sterilizacije garantuje da je potencijalno prisustvo kontaminanata moguće u jednom od million uzoraka proizvoda ili u jednom od hiljadu nasumičnih uzoraka iz bilo kog dela samog bioprocasa. Sterilnost bioprocasa podrazumeva inokulaciju čistom kulturom proizvodnog mikroorganizma u sterilnim uslovima i održavanje takvih uslova tokom čitavog perioda trajanja bioprocasa (Dodić i Grahovac, 2013).

### 3.3.3.5. SADRŽAJ RASTVORENOG KISEONIKA

Izbor bioreaktora i radnih uslova zavisi, u velikoj meri i od toga da li je mikroorganizam aeroban ili anaeroban. U slučaju aerobnih mikroorganizama, zahtevana količina kiseonika mora uvek biti rastvorena u hranljivoj podlozi. Pošto je rastvorljivost kiseonika u hranljivoj podlozi vrlo mala, mora se obezbediti kontinualno dovodenje i rastvaranje kiseonika, obično dispergovanjem vazduha u hranljivoj podlozi. Brzina prenosa kiseonika iz vazduha u hranljivu podlogu mora da odgovara brzini potrošnje kiseonika koja obezbeđuje maksimalnu produktivnost (Baras i sar., 2009).

Svakako, streptomicete se ubrajaju u aerobne mikroorganizme te im je za rast, razmnožavanje ali i za produkciju željenih metabolita neophodan kiseonik. Potreba za rastvorenim kiseonikom kod streptomiceta varira. Dok neke vrste rastu u sredinama sa niskim sadržajem kiseonika, druge pak zahtevaju njegov visok nivo u podlozi (Piret i Demain, 1988). Međutim, rastvaranje kiseonika u kultivacionoj tečnosti predstavlja veliki izazov. Najveća potrošnja kiseonika registruje se u fazi rasta kada postoji najveći rizik da količina rastvorenog kiseonika u podlozi dostigne svoj minimum (kritična koncentracija rastvorenog kiseonika). Kada količina kiseonika padne ispod pomenutog minimuma, sintetički putevi odgovorni za proizvodnju ne funkcionišu te do proizvodnje u neće doći. Na primer, istraživanja su pokazala da produkcija sekundarnih metabolita primenom streptomiceta uglavnom zahteva veliku količinu rastvorenog kiseonika, koja se obezbeđuje odgovarajućim odnosom intenziteta aeracije i brzine mešanja dok se sa povećanjem razmera izvođenja bioprocesa mora adekvatno povećavati i intenzitet aeracije (Liang i sar., 2008; Martins i sar., 2004).

Količina rastvorenog kiseonika utiče ne samo na rast biomase proizvodnog mikroorganizma i vrstu i koncentraciju produkovanih metabolita već i na morfologiju samih ćelija. Usled filamentoznog rasta *Streptomyces* sojeva kultivaciona tečnost se neretko ponaša kao nenjutnovski fluid, što dodatno otežava snabdevanje ćelija kiseonikom. Da bi se poboljšao transport kiseonika često se pribegava povećanju intenziteta mešanja (Olmos, 2013). Kiseonik se u bioreaktor dovodi komprimovanim vazduhom gde iz gasne faze (mehur) prelazi u hranljivu podlogu (tečna faza), a zatim difunduje do ćelije mikroorganizama (čvrsta faza) koje ga troše u biohemijским procesima. Fenomen prenosa kiseonika iz vazduha u supstrat predstavlja poseban problem. Rastvorljivost kiseonika je mala u odnosu na njegovu potrošnju. Ukoliko žive ćelije ne dobiju dovoljnu količinu kiseonika za svoje aktivnosti, jasno je da će proizvodnja u takvim okolnostima biti nezadovoljavajuća. Rastvaranje kao i apsorpcija kiseonika od strane mikroorganizama zavise od brojnih fizičkih i hemijskih parametara, sastava hranljive podloge, morfologije kulture kao i faze rasta u kojoj se nalazi (Jagani i sar., 2010).

Kako se kultivacija streptomiceta uglavnom odigrava submerzno, kiseonik se u medijum dovodi pomoću različitih sistema za aeraciju – raspodeljivača ili aeratora. U upotrebi su tri

osnovna tipa ovih uređaja: perforirani, prstenasti perforirani, cevasti perforirani i cevasti otvoreni raspršivači (Dodić i Popov, 2011; Stanbury i sar., 1995).

Aeracija može da bude direktna, kada se mehuri gasa raspodeljuju po čitavoj zapremini bioreaktora, i indirektna, kada je ograničena na deo zapremine bioreaktora, koji je odvojen sitastom pregradom. Tip distributera gasa je važan za barbotажne kolone i air-lift bioreaktore pri malim protocima gasa, kao i za sudove za mešanjem pri malim snagama mešanja. U nekim slučajevima dolazi do oštećenje ćelija koje su izložene mehurima gasa. Utvrđeno je da se ćelije oštećuju prilikom raspršivanja mehurova na slobodnoj površini tečne podloge. Ovaj problem se prevazilazi smanjenjem slobodne površine po jedinici zapremine, formiranjem vrlo malih mehurova (Baras i sar., 2009). Dimenzije pora na aeratorima i veličina mehurova ima značajan efekat na prenos mase u bioreaktoru. Što je mehur manji, to je veća dodirna površina, ali s druge strane, sadrže manju količinu kiseonika i sporije se kreću. Veliki mehurovi se kreću većom brzinom pa nema dovoljno vremena za iskorišćenje te veće zapremine kiseonika koju nose. Uglavnom su se mehurovi prečnika 2 – 3 mm pokazali kao optimalno rešenje (Rao, 2010).

Što se tiče *S. hygroscopicus*, u literaturi se aeracija od 1,5 l/l/min navodi kao optimalna za proizvodnju sekundarnih metabolita (Yen i Li, 2014). Međutim, pored aeracije veoma bitno je i mešanje kultivacione tečnosti koje čini kiseonik i hranljive nutrijente podloge mnogo dostupnije samim ćelijama proizvodnog mikroorganizma *Streptomyces* sp. što samim tim utiče i na bolju produkciju željenih metabolita.

### 3.3.3.6. MEŠANJE

Homogenizacija ima za cilj da ujednači sadržaj nutrijenata i metabolite, kao i temperature i pH sredine u ukupnoj zapremini kultivacionog medijuma, čime se obezbeđuju optimalni uslovi za željenu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma. Mešanjem kultivacionog medijuma omogućava se dispergovanje gasne faze, ujednačavanje sastava (sadržaj nutrijenata i metabolita), pH i temperature, suspendovanje čvrstih sastojaka (ćelije proizvodnog mikroorganizma i nerastvorljivi sastojci) i dispergovanje tečnih sastojaka koji se ne mešaju sa vodom (antipenušavci, različiti prekursori ili rastvarači u void nerastvornih sastojaka). Željeni stepen homogenizacije postiže se mešanjem koje obezbeđuje turbulentno kretanje u čitavoj zapremini kultivacionog medijuma. Intenzitet mešanja je ograničen energetskom efikasnošću primenjene operacije, penjenjem usled mešanja i aeracije, „povećanjem“ zapremine kultivacione tečnosti i negativnim delovanjem smicajnih sila na proizvodni mikroorganizam. S obzirom na specifičnost, za svaki mikrobiološki proces neophodno je izabrati mešanj pogodne geometrije, brzinu mešanja i trajanje ove operacije u primenjenim proizvodnim uslovima. U laboratoriji se najčešće izvodi eksterno mešanje (laboratorijske tresilice, poželjno rotacione). U poluindustrijskim i industrijskim razmerama mešanje je usko vezano sa uvođenjem gasa u kultivacioni medijum i vrši se mešalicom

(mehaničkom u 95% ili pneumatskom u 5% slučajeva) i/ili raspodeljivanjem gasne faze (Dodić i Grahovac, 2013).

Mešanje je operacija koja obezbeđuje uniformnost uslova unutar samog bioreaktora. Ta uniformnost se ogleda u što ravnomernijoj distribuciji svih komponenti bioprocesa, kako inokuluma i nutrijenata, tako i toplote i rastvorenog kiseonika. Maksimalna produktivnost, koncentracija produkta i kvalitet koji je moguće postići primarno zavise od mešanja i transporta kiseonika i mase. Primenjeni intenzitet mešanja zavisi od tipa bioprocesa, vrste impelera i karakteristika fluida (Paul i sar., 2004).

Nešto slabije ispitan, ali svakako značajan je uticaj sistema koji se koristi za mešanje. Mešalica ima zadatak da meša tečnosti i gasove unutar bioreaktora, da disperguje vazduh, obezbedi transport kiseonika i toplote, da održava uniformne uslove i poboljšava transport mase između dispergovanih faza. Mogu biti upotrebljene radijalne ili aksijalne mešalice različitih geometrijskih karakteristika (broj impelera, prečnik, visina na kojoj su postavljeni, broj i položaj odbojnika) (Dodić i Popov, 2011). Izbor načina mešanja zavisi od tipa bioreaktora koji se koristi za dobijanje biološki aktivnih jedinjenja, soja streptomiceta kao i karakteristika samog jedinjenja. Najčešće korišćen tip mešalice za aerobne fermentacije je Ruštonova disk mešalica koja obično ima šest ili osam impelera i postavlja se na više mesta u bioreaktoru radi bolje homogenizacije. Ova mešalica smatra se optimalnim dizajnom za upotrebu u procesima fermentacije jer obezbeđuje dobro mešanje od vrha do dna bioreaktora (Jagani i sar., 2010).

Kada je reč o kultivaciji streptomiceta, mešanje zahteva posebnu pažnju usled uticaja na morfologiju ćelija što može uticati i na njihovu produktivnost. Produkcija antifungalnih metabolita u tečnim podlogama povezana je sa morfološkim karakteristikama streptomiceta, tj. prečnikom fragmenata. Istraživanja su pokazala da forme manje od 80 – 90  $\mu\text{m}$  nisu produktivne iako se razmnožavaju kao i krupniji fragmenti. Yen i saradnici ispitali su efekat rastvorenog kiseonika na proizvodnju sekundarnih metabolita pri brzinama mešanja od 100 o/min i 150 o/min primenom *S. hygroscopicus*, pri čemu je veća produkcija uočena primenom manje brzine mešanja (Yen i Hsiao, 2013). Međutim, ispitivanja rađena na nekim drugim *Streptomyces* vrstama pokazala su da je povećanje intenziteta mešanja u pozitivnoj korelaciji sa sintezom produkata (Ser i sar., 2016; Sousa i sar., 2002).

Ispitivanje uticaja mešanja (agitacije) i aeracije u submerznim bioreaktorima je od velikog značaja jer proizvodni mikroorganizam *Streptomyces* sp. raste u submerznim uslovima bez direktnog kontakta sa gasnom fazom, što ograničava prenos kiseonika kako u sam medijum tako i unutar peleta koje streptomicete formiraju. Zbog svega navedenog, razvoj biotehnološkog postupka proizvodnje bioagenasa, antagonista skladišnih patogena jabuke, u uvećanim razmerama podrazumeva optimizaciju uslova izvođenja procesa sa posebnim akcentom na definisanje adekvatnog izvođenja aeracije i mešanja, kao ključnih parametara za *scale-up*, te je neophodno definisati intenzitet aeracije i mešanja koji će

omogućiti održavanje uniformnih i adekvatnih uslova u čitavoj zapremini bioreaktora što za cilj ima maksimizaciju prinosa željenih komponenti.

### 3.4. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA BIOPROCESA

Primena bioloških procesa u industrijskoj proizvodnji zahteva veoma složene postupke i složenu tehnološku opremu, radi ostvarenja specifičnih proizvodnih uslova (sterilnost, aerobnost ili anaerobnost i dr.), zatim složenu kontrolu, upravljanje procesima itd. Specifičnost uslova proističe iz činjenice da su akteri u bioprocima žive ćelije organizama ili njihovi delovi koji su veoma osetljivi na uslove okoline. Tek nedavno su naučnici, zahvaljujući sakupljenim neophodnim znanjima o biohemijskim reakcijama u živoj ćeliji, mernim instrumentima i bioreaktorima, kao i razvijenom matematičkom aparatu i računarskoj opremi i programima, omogućili uspešno modelovanje mikrobioloških procesa. Simulacija toka bioprocima testiranjem vrednosti parametara modela omogućava bolje razumevanje i objašnjavanje rezultata bioprocima. Razvijeni matematički modeli su se pokazali vrlo praktičnim i korisnim za različite aspekte biohemijskog inženjerstva, kao što su: povećanje razmera, kontrola, simulacija i optimizacija mikrobioloških procesa. Optimizacija bioprocima ima za cilj da omogući vođenje bioprocima u optimalnim uslovima, a u slučaju industrijskih bioprocima optimalno vođenje znači ostvarivanje ekonomskog optimuma.

Matematički modeli su matematički opisi bioprocima koji, iako često na uprošćenom nivou, dovoljno adekvatno predstavljaju njihovu prirodu. Obično su to grupe matematičkih formula ili jednačina koje opisuju bitne promene u toku bioprocima. Matematički modeli se „prave“ iz više razloga od kojih su najvažniji sledeći (Baras i sar., 2009):

- predviđanje konverzije supstrata ili proizvodnosti bioprocima,
- ispitivanje rada postrojenja u različitim uslovima,
- projektovanje bioprocima,
- povećanje razmera bioprocima,
- modifikacije u cilju unapređenja bioprocima,
- optimizovanje bioprocima,
- kompjutersko simuliranje bioprocima,
- identifikovanje nepoznatih uticajnih faktora i
- kontrola procesa.

Optimizacija predstavlja postupak pronalaženja neophodnih uslova koje je potrebno ispuniti da bi se postigao najbolji rezultat u datoj situaciji. U slučaju industrijskih bioprocima optimalno vođenje se vezuje za uslove maksimalnog prinosa proizvoda, maksimalne proizvodnosti i minimalne cene proizvoda koji najbolje određuju profitabilnost

industrijskog procesa (Baras i sar., 2009). Optimizaciju treba sprovoditi stalno, ali uvek smišljeno, i to u svim fazama bioprocesa: od odabira proizvodnog mikroorganizma, odabira hranljive podloge za kultivaciju ali i odabira najboljih procesnih uslova (Sing i Rai, 2012).

Klasična tehnika za optimizaciju sistema sa više ulaznih promenljivih obično posmatra postupno svaki pojedinačni faktor, umesto da ih sve sagleda istovremeno. Ova tehnika zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata i nije u mogućnosti da otkrije potencijalne zavisnosti između komponenti. Brojne statističke metode planiranja eksperimenata su poslednjih godina primenjivane za optimizaciju različitih bioprocesa. Ove metode podrazumevaju korišćenje matematičkih modela za projektovanje fermentacionih procesa i analiziranje njihovih rezultata. Metoda odzivne površine funkcije, RSM (engl: Response Surface Methodology), jedna je od najčešće primenjenih tehnika u mnogim oblastima naučnog istraživanja.

Eksperiment ima veoma važnu ulogu pri razvoju novih proizvoda, kao i razvoju i poboljšanju procesa proizvodnje. Zbog toga, on zauzima centralno mesto u nauci, naročito danas, zbog kompleksnosti problema sa kojima se nauka suočava (Grahovac, 2014). Svrha statističkog planiranja eksperimenata je da se sakupi maksimalan broj relevantnih informacija u što kraćem vremenu i sa što manje sredstava. Važno je da planiranje eksperimenata treba da bude najjednostavnije moguće i da odgovara zahtevima problema. Stoga planiranje eksperimenata zahteva novi pristup u istraživanjima, što se bitno razlikuje od tradicionalnih (klasičnih) metoda empirijskog istraživanja (Lazić, 2004).

### **3.4.1. POSTUPAK ODZIVNE POVRŠINE**

RSM spada u najčešće korišćene postupke statistički planiranih eksperimenata (Myers i Montgomery, 2002). Ova metoda eliminiše nedostatke klasičnih metoda i pokazala se kao moćna i korisna za optimizaciju proizvodnje različitih metabolita. Takođe se može koristiti za procenu značaja nekoliko varijabli istovremeno (Gao i sar., 2009).

Dakle, ova metoda ima važnu primenu u izradi modela, razvoju i formulisanju novih proizvoda, kao i u unapređenju postojećih proizvodnih modela. Takođe, na ovaj način se jasno definiše uticaj pojedinačnih nezavisnih promenljivih ili njihove kombinacije na proces. Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog plana ključan je korak u primeni postupka odzivne površine (Ferreira i sar., 2007).

Osnovna prednost metode odzivne površine je u tome što je potreban manji broj eksperimentalnih podataka da bi se obezbedio dovoljan broj informacija za dobijanje statistički validnih rezultata. RSM jednačine opisuju parametre sistema i njihov uticaj na posmatrane odzive sistema, određuju međuzavisnosti testiranih promenljivih i ispituju kombinovane efekte parametara procesa na posmatrane odzive, omogućavajući da se efikasno istražuje proces.



Zavisnost između zavisno promenljive (posmatranih odziva) i nezavisno promenljive (variranih faktora) opisuje se sledećom jednačinom (99. Montgomery, 2005):

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + e$$

gde je:

Y – odziv, analizirani parametar

f – funkcija odziva

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ... X<sub>k</sub> – ispitivani faktori

k – broj ispitivanih fakora

e - predstavlja ostale uticajne faktore koji nisu obuhvaćeni funkcijom *f* (greška merenja, uticaj drugih faktora koji ne ulaze u *RSM* jednične...).

S obzirom da na uspešnost izvođenja bioprocesa utiče više faktora, potrebno je selektovati samo one parametre koji su najvažniji za efikasnost konkretnog bioprocesa. Nakon njihovog odabira, veoma je važno definisati granice u kojima će biti varirani, odnosno njihove nivoe. U istraživanjima se najčešće koristi Boks-Benkenov eksperimentalni dizajn (BBD, engl. Box-Behnken Design) i centralni kompozitni dizajn (CCD, engl. Central Composite Design). BBD ima prednost nad ostalima u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti. BBD sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački podrazumeva izvođenje 15 eksperimenata. Efikasnost ovog eksperimentalnog plana je veća u odnosu na efikasnost CCD. Međutim, efikasnost Boks-Benkenovog plana se gubi kada se posmatra sistem sa četiri i više promenljivih (Ferreira i sar., 2007).

### 3.4.2. METODA ŽELJENE FUNKCIJE

Metoda željene funkcije (engl. desirability function) jedan je od najčešće primenjivanih postupaka za optimizaciju bioprocesa sa dva ili više variranih odziva. Princip obrade podataka kod ove metode sastoji se u konvertovanju individualnih odziva u individualne željene funkcije čije se vrednosti kreću od 0 do 1. Vrednost individualne željene funkcije "0" predstavlja najlošiju vrednost, dok vrednost "1" predstavlja najbolju vrednost posmatranog odziva. Ukupna željene funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija (Ferreira i sar., 2007). Visoke vrednosti D pokazuju najbolje vrednosti funkcije u sistemu koje odgovara optimalnom rešenju posmatranog sistema. Optimalne vrednosti eksperimentalnih parametara određuju se iz vrednosti pojedinačnih željenih funkcija koje optimizuju ukupnu željenu funkciju (Jokić i sar., 2010).

## 4. MATERIJAL I METODE

---

## 4.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

### 4.1.1. IZOLACIJA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Izolati koji su korišćeni kao test organizmi izolovani su iz plodova jabuka sa simptomima truleži. Plodovi su uzorkovani tokom 2012. godine nakon četiri meseca skladištenja u Ultra Low Oxygen hladnjači na teritoriji Republike Srbije (AP Vojvodina). Izolovani sojevi se čuvaju na agarizovanoj podlozi odgovarajućeg sastava u zbirci kultura Laboratorije za dijagnostiku bolesti, štetočina i korova Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Patogeni su izolovani koristeći standardne fitopatološke tehnike. Inficirani plodovi jabuke su oprani i površinski sterilisani 3% natrijum-hipohloratom (NaOCl) a potom isprani sterilnom vodom. Na prelazu zdravog u obolelog tkiva aseptično su uzeti fragmenti ploda jabuke ispod kore, naneti na sterilnu PDA podlogu (tabela 4.1.) i inkubirani sedam dana na 25°C (Dhingra i Sinclair, 1995). Nakon sedam dana, razvijena micelija je prekultivisana na novu Petri ploču sa sterilnom PDA podlogom u cilju dobijanja čiste kulture. Inkubacija je vršena 3 dana na 20°C nakon čega su kulture čuvane u frižideru na 4°C do momenta dalje upotrebe. Iz kolekcije čistih kultura otklonjene su one za koje se sa sigurnošću na osnovu mikro i makroskopskih morfoloških karakteristika moglo utvrditi da ne pripadaju rodovima *Alternaria* i *Fusarium*.

Tabela 4.1. Sastav hranljivih podloga za test mikroorganizme

Sastojci podloge	Podloga za osvežavanje kulture	Podloga za umnožavanje kulture
	mikroorganizama PDA (potato dextrose agar)	mikroorganizama PDB (potato dextrose broth)
Voda	1000 ml	1000 ml
Krompir	200 g	200 g
Dekstroza	20 g	20 g
Agar	20 g	-

Formiranje monosporijalnih kultura *Fusarium* sp. izvršeno je po metodi (Burgess i sar. (1994). U epruvetu sa sterilnom vodom, iz kulture gljive je aseptično uneta jedna konidiomata (*Fusarium* sp.) pronađena pod binokularom. Sadržaj epruvete je izmešan na vrtložnoj mešalici (Vortex®) i 1000 µl ovako dobijene suspenzije naneto je na sterilnu podlogu od vode i agara (WA podloga) u Petri ploče prečnika 85 mm. U slučaju *Alternaria* sp., suspenzija spora je pripremljena tako što je u kulturu starosti sedam dana na PDA podlozi uneto 1000 µl sterilne, destilovane vode, kultura je sastrugana sa podloge, a spore su profiltrirane kroz sterilnu gazu. Suspenzija je takođe uneta u Petri ploče sa WA podlogom. Protresanjem ploča, unete suspenzije su ravnomerno raspoređene po površini podloge. Petri ploče su potom postavljene u iskošeni položaj i kada se višak suspenzije slio na jednu stranu, pod plamenom je aseptično dekantovan sa Petri ploče. Petri ploče su zatim u kosom položaju inkubirane 24 h u termostatu na 25°C. Potom je pod mikroskopom pronađena jedna

proključala spora i aseptično preneti na PDA podlogu i inkubirana u termostatu na 25°C do formiranja kolonije (Grahovac i sar, 2014).

Patogenost monosporijalnih izolata koje su na osnovu morfoloških karakteristika kolonije i reproduktivnih struktura identifikovani kao *Alternaria* sp. i *Fusarium* sp., proverena je veštačkom inokulacijom plodova jabuke sorte Zlatni delišes po metodi Vignutelli i sar., (Vignutelli i sar., 2002).

#### 4.1.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA *Alternaria* sp. I *Fusarium* sp.

Ispitivani izolati *Alternaria* sp. i *Fusarium* sp. molekularno su identifikovani primenom metode lančane reakcije polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction) (Elles i Mountford, 2003). Izvršeno je kloniranje ITS sekvenci ribozomalne DNK pomoću univerzalnih prajmera. Dobijeni fragmenti su sekvencionirani i analizom sekvenci je utvrđena njihova pripadnost vrsti.

##### 4.1.2.1. IZOLACIJA DNK GLJIVA

Ukupna količina DNK je izolovana iz sedam dana stare micelije izolata gajenih na PDA podlozi primenom komercijalnog kompleta DNEasy Plant Mini Kit (Quiagen) prateći instrukcije koje su dostavljene uz izolacioni komplet.

##### 4.1.2.2. KLONIRANJE SEKVENCI rDNK-ITS REGIONA

ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) ribozomalne DNK amplifikovan je primenom univerzalnih prajmera (tabela 4.2.) ITS1 i ITS4 (123. White i sar., 1990). PCR reakcija za svaki izolat je izvedena u konačnoj zapremini od 25 µl koja je sadržala: 12.5 µl 2 X Master mix (Fermentas, Litvanija) (0,625 U Taq polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dNTP-a) po 1 µl svakog prajmera (0,2 µM), 1 µl izolovane DNK. Do konačne zapremine od 25 µl dodata je DNA free voda.

Kloniranje ITS regiona ribozomalne DNK izvedeno je u PCR aparatu (Eppendorf Master Cycler). Uslovi reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK: 1,5 minut na 94°C

##### 29 ciklusa:

- Denaturacija: 30 sekundi na 94°C
- Hibridizacija: 30 sekundi na 55°C

- Elongacija: 30 sekundi na 72°C
- Finalna elongacija: 9,5 minuta na 72°C.

Tabela 4.2. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju ITS regiona izolata test gljiva

Prajmer	Naziv prajmera	Sekvenca 5' – 3'	Literaturni izvor
Forward	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White i sar. (1990)
Revers	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Dobijeni PCR produkti razdvojeni su horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu u 1xTBE pufera. Gelovi su obojeni etidijum bromidom i očitani na UV iluminatoru. Amplifikovani fragmenti su prečišćeni pomoću kompleta za prečišćavanje: mi-PCR Purification Kit (Metabion International, Nemačka), prema uputstvu proizvođača. PCR produkti su poslani na uslužno sekvencioniranje u oba smera u Koreju.

Nakon provere kvaliteta svake sekvence, izvršeno je poravnavanje sekvenci korišćenjem ClustalW programa (Thompson i sar., 1997), u okviru programskog paketa BioEdit v7.0.5.3 (Hall 1999), a sekvence su analizirane metodom BLAST (engl. Basic Local Alignment Search Tool) u okviru baze podataka genomskih informacija dostupnih na NCBI (engl. National Center for Biotechnology Information).

#### 4.2. PROIZVODNI MIKROORGANIZAM I PRIPREMA INOKULUMA

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je proizvodna sposobnost mikroorganizma *S. hygrosopicus* u cilju produkcije antagonista skladišnih patogena jabuke. *S. hygrosopicus* izolovan je iz prirodnog okruženja, uzoraka zemljišta prikupljenih na nekoliko lokacije sa teritorije grada Novog Sada, Srbija. Prema uputstvima datim u Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams i sar., 1983, Cross, 1989), analiza morfoloških i fizioloških karakteristika izolata utvrđeno je da se radi o rodu *Streptomyces*. Soj je dalje ispitivan na podlozi koja podstiče sporulaciju pri čemu je utvrđeno da se vremenom razvija bela vazdušasta micelija da bi se nakon sporulacije javile tamno sive do skoro crne sitne oblasti koje su znak nastanka spora. Uporednom analizom nekih morfoloških, biohemijskih i fizioloških osobina visoko aktivnih *Streptomyces* sojeva dovelo je do zaključka da je ispitivana vrsta najverovatnije *S. hygrosopicus*.

Molekularna identifikacija proizvodnog mikroorganizma urađena je u saradnji sa Laboratorijom za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za

molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu. Metode koje se danas najčešće koriste za identifikaciju taksonomskih grupa su hibridizacija nukleinskih kiselina i amplifikacija 16S rRNK reakcijom lančane polimerizacije pomoću prajmera koji su dizajnirani na osnovu visoko konzerviranih regiona 16S rRNK gena. Poređenjem dobijenih 16S rRNK sekvenci sa bazom podataka omogućava se rekonstrukcija filogenetske pozicije ispitivanog soja, a samim tim tako dobijeni rezultati mogu se iskoristiti za determinaciju filogenetskih i evolutivnih odnosa između organizama (Mehling i sar., 1995). Analizom sekvence gena za 16S rRNK dokazano je da ispitivana bakterija iz zbirke kultura Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu pripada rodu *Streptomyces*. Daljom analizom je potvrđeno da se radi o vrsti *S. hygrosopicus* (Mojićević i sar).

Proizvodni soj *S. hygrosopicus*, se dugi niz godina čuva na agarizovanoj podlozi odgovarajućeg sastava (g/L): glukoza (15.0), sojino brašno (10.0), CaCO<sub>3</sub>, (3.0), NaCl, (3.0), MgSO<sub>4</sub>, (0.5), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (0.5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (1.0), agar (20). pH podloge je neposredno pre sterilizacije podešen na 7.2 ± 0.1.

Za osvežavanje i umnožavanje proizvodnog mikroorganizma *S. hygrosopicus*, korišćene su podloge prikazane u tabeli 4.3. Podloga za umnožavanje ujedno je korišćena i kao podloga za pripremu inokuluma.

Tabela 4.3. Sastav hranljivih podloga za osvežavanje i umnožavanje proizvodnog mikroorganizma

Sastojci podloge	Podloga za osvežavanje [g/l]	Podloga za umnožavanje [g/l]
Glukoza	15,0	15,0
Sojino odmašćeno brašno	10,0	10,0
CaCO <sub>3</sub>	3,0	3,0
NaCl	3,0	3,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	1,0
Agar	20,0	-
pH [1]	7,2±0,1	7,2±0,1

Priprema inokuluma tekla je u dve faze. U prvoj fazi vrši se osvežavanje proizvodnog mikroorganizma na podlozi za osvežavanje, inkubacijom u toku 72 h na 27±1°C. U drugoj fazi se soj presejava u tečnu podlogu za umnožavanje mikroorganizma u količini dovoljnoj za inokulaciju kultivacionog medijuma. Priprema potrebne količine inokuluma izvršena je dvostrukim pasažiranjem. Druga pasaža zasejana je sa 10% inokuluma proizvedenog prvim pasažiranjem. Inkubacija svake pasaže trajala je 96 h, na 27±1°C u aerobnim uslovima. Za aeraciju i mešanje kultivacione tečnosti tokom pasažiranja korišćena je rotaciona tresilica pri 150 o/min (IKA KS 4000i Control Incubating Shaker).

Podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma inokulisane su sa 10% inokuluma pripremljenog prema opisanom postupku.

Kao potencijalni antagonisti, pored *S. hygrosopicus* ispitana su još tri mikroorganizma: *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus cereus* i *Leuconostoc mesenteroides* koji se čuvaju u zbirci kultura Tehnološkog fakulteta Novi Sad.

Za čuvanje i osvežavanje proizvodnog mikroorganizma *S. cerevisiae* korišćena je komercijalna podloga Sabouraud maltozni agar (Torlak®), dok je za umnožavanje i kultivaciju korišćen Sabouraud maltozni bujon (Torlak®). Kultivacija proizvodnog mikroorganizma trajala je 48 h, na  $28\pm 1^\circ\text{C}$  u erlenmajerima zapremine 300 ml sa 100 ml podloge. Za aeraciju i mešanje kultivacione tečnosti tokom kultivacije korišćena je rotaciona tresilica pri 150 o/min (IKA KS 4000i Control Incubating Shaker).

Za čuvanje i osvežavanje proizvodnog mikroorganizma *B. cereus* korišćena je komercijalna podloga Muller-Hinton agar (Torlak®). Umnožavanje proizvodnog mikroorganizma i njegova kultivacija izvršeni su na podlozi Muller-Hinton bujon (Torlak®). Kultivacija je trajala 4 dana na  $28\pm 1^\circ\text{C}$  u erlenmajerima zapremine 300 ml sa 100 ml podloge za kultivaciju uz brzinu mešanja 150 o/min pomoću rotacione tresilice.

Umnožavanje i biosinteza proizvodnog mikroorganizma *L. mesenteroides* izvedena je na podlozi sledećeg sastava (g/l): saharoza (100.0), ekstrakt kvasca (2.5),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (5.0),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.2),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2), NaCl (0.6). Kao podloga za čuvanje i osvežavanje korišćena je agarizovana podloga za biosintezu sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$  (20 g/l). Kultivacija proizvodnog mikroorganizma trajala je 24 h na  $22\pm 1^\circ\text{C}$  u stacionarnim uslovima.

Po završetku kultivacije, kultivacione tečnosti su centrifugirane na 10000 o/min (Rotina 380 R, Hettich, Germany) 10 minuta i supernatanti su korišćeni za ispitivanje antagonističke aktivnosti *in vitro* na četiri test fitopatogena izolata.

## 4.3. HRANLJIVE PODLOGE I USLOVI BIOSINTEZE

### 4.3.1. HRANLJIVE PODLOGE

U oglecima čiji je krajnji cilj bio da se ispita uticaj vrednosti pH podloge za biosintezu na produkciju antagonista skladišnih patogenih jabuke primenom proizvodnog mikroorganizma *S. hygrosopicus*, korišćena je podloga za umnožavanje (tabela 4.3). Uticaj vrednosti pH podloge na produkciju praćena je kroz osam eksperimenata sa različitim vrednostima pH ( $3 - 10 \pm 0,1$ ). Vrednosti pH podloga podešene su koristeći HCl (1 M) i NaOH (1 M) neposredno pre sterilizacije (Ripa i sar., 2009).

Poznato je da osmotski pritisak podloge značajno utiče na produkciju sekundarnih metabolita. Stoga, cilj ovog ogleada bio je odabir optimalnog osmotskog pritiska u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*, što je ispitano variranjem količine NaCl u podlozi. NaCl je variran u koncentracijama od 0%, 0.3%, 1%, 2%, 3%, 4% i 5% (Singh i sar., 2009; Ripa i sar., 2009). Eksperimenti u okviru ove faze istraživanja rađeni su na podlozi za umnožavanje streptomiceta (tabela 4.3.) čiji je pH podešen na  $7 \pm 0,1$  neposredno pre sterilizacije na 121 °C i pritisku 2,1 bar u trajanju od 20 minuta.

Ogled koji je za cilj imao ispitivanje uticaja dužine trajanja kultivacije na proizvodnju antagonista skladišnih patogena jabuke izvršena je na podlozi čiji je sastav isti kao podloga za umnožavanje proizvodnog mikroorganizma (tabela 4.3). Vrednost pH podloge podešen je na  $7 \pm 0,1$  neposredno pre sterilizacije.

U eksperimentima koji su za cilj imali odabir najboljeg izvora ugljenika i azota u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*, ispitano je šest izvora ugljenika (glukoza (Gc), fruktoza (F), laktoza (L), maltoza (M), skrob (S) i glicerol (Gy)) i četiri izvora azota (ekstrakt kvasca (EK), pepton (Pep), sojino brašno (SB),  $\text{NaNO}_3$ ) i jedan u koji nije naknadno dodat izvor azota (bez N). U eksperimentu su ispitane sve kombinacije izvora ugljenika i azota. Za pripremu podloga testirani izvori ugljenika i azota primenjeni su u količinama u kojima se obezbeđuje ista količina ovih nutrijenata kao u podlozi za kultivaciju streptomiceta (tabela 4.3). Kjeldal (Kjeldahl) metoda korišćena je u svrhu dobijanja podataka o količini azota u organskim izvorima primenjenim u ovom eksperimentu (Herlich, 1990). Dobijeni rezultati pokazuju da je količina azota u sojinom brašnu, ekstraktu kvasca i peptonu, 8%, 10,5% i 14,8%, respektivno. Kultivacija je izvršena na podlogama koje su pored odabrane kombinacije izvora ugljenika i azota sadržala i sledeće nutrijente (g/l):  $\text{CaCO}_3$  (3.0), NaCl (3.0),  $\text{MgSO}_4$  (0.5),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0.5),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1.0). Vrednost pH svih podloga podešena je na  $7 \pm 0,1$  pre sterilizacije.

Hranljive podloge u ogedima koji su za cilj imali definisanje optimalnih količina odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*, pripremljene su u skladu sa Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom (tabela 4.4). U podlogama su varirani sadržaj glicerola (5; 12,5 i 20 g/l), sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,25; 0,5 i 0,75 g/l) i sadržaj  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1; 2 i 3 g/l). Osim nutrijenata variranih po Boks-Benkenovom planu, podloge su sadržale i sledeće nutrijente (g/l):  $\text{CaCO}_3$  (3,0), NaCl (3,0),  $\text{MgSO}_4$  (0,5),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0,5),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0). Vrednost pH podloga podešen je na  $7 \pm 0,1$  pre sterilizacije.

U eksperimentima čiji je krajnji cilj optimizacija vrednosti procesnih parametara važnih za sadržaj rastvorenog kiseonika u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*, korišćena je podloga optimalnog sastava dobijena u prethodnoj fazi istraživanja. Vrednost pH podloga podešen je na  $7 \pm 0,1$  pre sterilizacije.



Tabela 4.4. Box-Behnkenov plan eksperimenta i varirane vrednosti parametara

Redni broj eksperimenta	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti [g/l]		
	X1	X2	X3	Sadržaj glicerola	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1	-1	-1	0	5	0,25	2
2	1	-1	0	20	0,25	2
3	-1	1	0	5	0,75	2
4	1	1	0	20	0,75	2
5	-1	0	-1	5	0,25	1
6	1	0	-1	20	0,25	1
7	-1	0	1	5	0,25	3
8	1	0	1	20	0,25	3
9	0	-1	-1	12,5	0,25	1
10	0	1	-1	12,5	0,75	1
11	0	-1	1	12,5	0,25	3
12	0	1	1	12,5	0,75	3
13	0	0	0	12,5	0,5	2
14	0	0	0	12,5	0,5	2
15	0	0	0	12,5	0,5	2

Eksperiment u kome je ispitana validnost dobijenih rezultata izvršen je na podlozi optimalnog sastava primenom optimalnih procesnih uslova dobijenih u prethodnim fazama istraživanja. Vrednost pH podloge podešen je na  $7 \pm 0,1$  pre sterilizacije.

#### 4.3.2. USLOVI BIOSINTEZE

Eksperimenti koji su za cilj imali odabir odgovarajuće vrednosti pH podloge za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus*, izvedeni su u erlenmajerima zapremine 100 ml sa 30 ml podloge. Kultivacija je trajala 7 dana na  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , a za mešanje i aeraciju kultivacione tečnosti korišćena je rotaciona tresilica sa brzinom mešanja 150 o/min (IKA KS 4000i Control Incubating Shaker).

Ogledi u kojima je ispitan uticaj osmotskog pritiska na biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus*, trajali su 7 dana na  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Kultivacija je izvedena u erlenmajerima zapremine 100 ml sa 30 ml podloge, a za mešanje i aeraciju kultivacione tečnosti korišćena je rotaciona tresilica sa brzinom mešanja 150 o/min.

Eksperiment u kome je cilj bio da se ispita uticaja dužine trajanja kultivacije na proizvodnju antagonista skladišnih patogena jabuke izvršen je u laboratorijskom bioreaktoru (Biostat Aplus, Sartorius AG, Germany) ukupne zapremine 3 l i radne zapremine 2 l sa internim mešanjem pomoću dve paralelno postavljene Ruštonove turbine bez interno postavljenih

odbojnika, sa automatskim merenjem i regulacijom procesnih parametara. Tokom 168 h trajanja bioprocesa brzina mešanja je bila konstantna, 200 o/min, intenzitet aeracije je održavan na 0,5 l/l/min a temperatura na  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Eksperimenti koji su za cilj imali odabir najboljeg izvora ugljenika i azota u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus*, izvedeni su u erlenmajerima zapremine 300 ml sa 100 ml podloge za kultivaciju. Rotaciona tresilica (IKA KS 4000i Control Incubating Shaker) na 150 o/min korišćena je za mešanje i aeraciju kultivacionih tečnosti tokom 7 dana kultivacije na  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Tokom eksperimenta vrednost pH podloge praćen je specijalnom elektrodom, ali nije korigovan.

Erlenmajeri radne zapremine 300 ml sa 100 ml odgovarajuće podloge definisane Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom korišćeni su za kultivaciju *S. hygroscopicus* u ogledima u kojima je cilj bio odabir optimalnih količina odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora. Kultivacija je trajala 7 dana na  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  na rotacionoj tresilici sa brzinom mešanja 150 o/min.

Eksperimenti koji su za cilj imali odabir optimalne brzine mešanja i intenziteta aeracije izvedeni su u bioreaktoru (Biostat Aplus, Sartorius AG, Germany) ukupne zapremine 3 l i radne zapremine 2 l sa internim mešanjem pomoću dve paralelno postavljene Ruštonove turbine bez interno postavljenih odbojnika, sa automatskim merenjem i regulacijom procesnih parametara. Odnos prečnika mešalice i prečnika suda ( $d/D_i$ ) iznosi 0,38. Proizvodnja antagonista skladišnih patogena jabuke izvedena je u trajanju od 168 h u aerobnim uslovima.

U skladu sa odabranim eksperimentalnim planom (pun faktorijalni dizajn  $3^3$  sa tri ponavljanja u centralnoj tački) u eksperimentima je varirana brzina mešanja (100, 200 i 300 o/min) i intenzitet aeracije (0,5; 1 i 1,5 l/l/min) u vremenskim intervalima u kojima se pod definisanim uslovima proizvede odgovarajuća količina željenih antagonističkih agenasa (96, 120 i 144 h) (tabela 4.5). Temperatura je održavana na  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  do kraja bioprocesa posebnim sistemom za internu regulaciju. Vrednost pH podloge je praćen specijalnom elektrodom, ali nije korigovan tokom eksperimenta.

Ogled u kome je ispitana validnost dobijenih rezultata u uvećanim razmerama izveden je u laboratorijskom bioreaktoru (Chemap AG CH-8604, Volketswil, Switzerland) ukupne zapremine 7 l i radne zapremine 5 l sa odnosom  $d/D_i$  od 0,44. Kultivacija je trajala 168 h pri konstantnoj temperaturi od  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  koja je interno regulisana. Vrednost pH podloge je specijalnom elektrodom meren tokom eksperimenta, ali nije korigovan. Tokom ovog ogleda korišćene su optimalne vrednosti intenziteta aeracije i brzine mešanja dobijeni optimizacijom u prethodnoj fazi istraživanja. Aeracija je vršena posebnim sistemom za aeraciju, a mešanje je omogućeno primenom dve paralelno postavljene Ruštonove turbine na rastojanju 90 mm i primenom četiri vertikalno postavljena odbojnika.

Tabela 4.5. Plan eksperimenta i varirane vrednosti ulaznih parametara

Redni broj eksperimenta	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti		
	X1	X2	X3	mešanje	aeracija	vreme
1	-1	1	1	100	1,5	144
2	0	-1	0	200	0,5	120
3	0	0	-1	200	1,0	96
4	0	0	1	200	1,0	144
5	-1	1	0	100	1,5	120
6	1	1	1	300	1,5	144
7	0	0	0	200	1,0	120
8	1	0	1	300	1,0	144
9	-1	0	-1	100	1,0	96
10	0	1	0	200	1,5	120
11	0	0	0	200	1,0	120
12	0	1	-1	200	1,5	96
13	1	0	-1	300	1,0	96
14	0	1	1	200	1,5	144
15	-1	0	0	100	1,0	120
16	-1	-1	-1	100	0,5	96
17	1	-1	1	300	0,5	144
18	1	1	0	300	1,5	120
19	1	-1	-1	300	0,5	96
20	0	0	0	200	1,0	120
21	-1	1	-1	100	1,5	96
22	0	-1	-1	200	0,5	96
23	-1	-1	0	100	0,5	120
24	0	0	0	200	1,0	120
25	0	-1	1	200	0,5	144
26	-1	-1	1	100	0,5	144
27	1	-1	0	300	0,5	120
28	1	0	0	300	1,0	120
29	1	1	-1	300	1,5	96
30	-1	0	1	100	1,0	144

#### 4.4. ANALIZA UZORAKA KULTIVACIONE TEČNOSTI

U eksperimentima u kojima je ispitan uticaj vrednosti pH podloge, osmotskog pritiska, odabir izvora ugljenika i azota kao i optimizacija količine odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus*, analiza uzoraka kultivacione tečnosti izvršena je nakon sedmog dana odnosno na kraju bioprocasa.

U ogledu u kome je cilj bio da se ispita uticaj dužine trajanja kultivacije na proizvodnju antagonista skladišnih patogena jabuke u laboratorijskom bioreaktoru, analizirani su na svaka 24 sata od početka kultivacije. Uzorci su zatim korišćeni u svrhu dobijanja podataka o toku bioprocesa proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus* kao i ispitivanja aktivnosti *in vitro* na primenjene test fitopatogene izolate. Uzorkovanje je izvršeno u sterilnim uslovima. Da bi se dodatno ispitala stabilnost antifungalnih metabolita, uzorci kultivacione tečnosti su kuvani 45 minuta (Prapagdee i sar., 2008a). Delovanje termički tretiranih kultivacionih tečnosti na četiri skladišna patogena određena je u 85-mm Petri pločama metodom bunara.

Uzorci kultivacione tečnosti kod svih oglada sprovedenih u bioreaktoru (optimizacija brzine mešanja i intenziteta aeracije i validacija dobijenih rezultata), analizirani su na svakih 12 sati od početka kultivacije i korišćeni su za ispitivanje toka bioprocesa proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus* kao i ispitivanje aktivnosti *in vitro* na primenjene test fitopatogene izolate. Uzorkovanje je izvršeno u sterilnim uslovima.

Razdvajanje čvrste i tečne faze kultivacione tečnosti izvršeno je centrifugiranjem na 10000 o/min u trajanju od 10 minuta (Rotina 380 R, Hettich, Germany). Supernatant kultivacione tečnosti određen za analitička određivanja raspoređen je u penicilinske bočice i skladišten do momenta analiziranja na  $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Za praćenje vrednosti pH (Hamilton, Easyferm plus K8 200, Germany), temperature, količine rastvorenog kiseonika (Hamilton, Oxyferm FDA 225, Germany), brzine mešanja i vremena kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 3 l korišćene su odgovarajuće elektrode i senzori koji su sastavni deo primenjenog laboratorijskog bioreaktora opremljenog odgovarajućim softverskim paketom (Biostat Aplus, Sartorius AG, Germany).

Pored uobičajenih metoda (elektroda) za praćenje vrednosti pH (Mettler Toledo InProx<sup>®</sup>325X, USA), temperature, količine rastvorenog kiseonika (Mettler Toledo, InPro 6950i, USA), brzine mešanja i vremena u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 7 l (Chemap AG CH-8604, Volketswil, Switzerland), primenjene su i druge analitičke metode za određivanje rezidualnog sadržaja nutrijenata u podlozi za kultivaciju.

Određivanje sadržaja rezidualnih šećera (glukoze i glicerola) u kultivacionom medijumu tokom kultivacije i na kraju bioprocesa, određivan je u supernatantu kultivacione tečnosti HPLC instrumentalnom metodom. Pre analiziranja uzorci su propušteni kroz 0,45 µm najlonski filter (Agilent Technologies, Germany), a zatim analizirani. HPLC instrument (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 series) opremljen je HPG-3200SD/RS pompom, WPS-3000(T) SL autosemplerom, ZORBAX NH2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolonom i refraktometarskim detektorom (RefractoMax520). Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 10 µl. Za određivanje rezidualne glukoze, kao mobilna faza korišćen je acetonitril (75:25,

v/v) sa protokom od 1,2 ml/min, a za određivanje rezidualnog glicerola korišćen je acetonitrile (70:30, v/v) sa protokom od 1 ml/min. Vreme elucije bilo je 20 minuta, a temperature kolone održavana na 25°C kod određivanja glukoze i 30°C kod određivanja rezidualnog glicerola.

Sadržaj ukupnog azota u tečnoj fazi kultivacione tečnosti određen je metodom po Kjeldalu (Herlich, 1990).

Sadržaj ukupnih fosfata u tečnoj fazi kultivacione tečnosti određen je spektrofotometrijskom metodom sa rastvorom anhidrovanog kalijum-dihidrogenfosfata kao standardom (Gales i sar., 1966).

Suva materija taloga kultivacione tečnosti određena je sušenjem do konstantne mase. Postupak određivanja podrazumeva sušenje 5 ml kultivacione tečnosti na 105 °C u sušnici sve dok se dve uzastopno izmerene mase nisu razlikovale za maksimalno 5 jedinica na četvrtoj decimali. Sadržaj suve materije (SM) određen je u skladu sa preporukama gravimetrije i izračunava se prema sledećoj jednačini:

gde je:

$$SM = \frac{ms - m_0}{mv - m_0} * 100$$

SM – sadržaj suve materije u uzorku, (%),

$m_0$  – masa osušenog praznog vegeglasa, (g),

$m_v$  – masa vegeglasa sa vlažnim uzorkom, (g),

$m_s$  – masa vegeglasa sa osušenim uzorkom, (g).

#### 4.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTAGONISTA *in vitro*

Antifungalna aktivnost proizvoda metabolizma *S. hygroscopicus* određivana je u *in vitro* uslovima na ispitivane skladišne patogene jabuka *A. alternata* KA10 i T1Jg3 i *F. avenaceum* KA12 i KA13.

Test gljive su prvobitno gajene na PDA podlozi na temperaturi 25°C u trajanju od sedam dana. Nakon sedam dana mala količina micelije sa svakog od izolata se prenosi u 50 ml PDB tečne podloge koja se inkubira 72 h pri temperaturi 25°C u aerobnim uslovima. Za aeraciju i mešanje korišćena je rotaciona tresilica pri 150 o/min. Neposredno pre postavljanja *in vitro* oglada kultura se profiltrira kroz dvostruki sloj sterilne gaze.

Postupak se izvodi u Petri pločama prečnika 85 mm primenom metodom sa bunarima (146. Segy, 1983). U Petri ploče se nanose dva sloja PDA podloge različite koncentracije. Prvo se

nanosi sloj 2% PDA podloge a nakon očvršćavanja nanosi se drug sloj koji sadrži 1,2% PDA podlogu u koju je dodato 30% filtrata test gljive. U svakoj Petri ploči su aseptično napravljena po tri bunara prečnika 15 mm u koji se nanosi po 100 µl supernatanta *S. hygrosopicus*. Sterilna destilovana voda korišćena je kao kontrola. Nakon inkubacije, u trajanju od 72h na temperaturi 27°C, mereni su prečnici (mm) zona inhibicije oko bunara – zone oko bunara u kojima nema rasta testirane gljive.

#### 4.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTAGONISTA *in planta*

Za potrebe određivanja aktivnosti antagoniste *in planta* korišćeni su tehnološki zreli plodovi jabuke sorte Zlatni delišes. Plodovi su oprani pod tekućom vodom i osušeni, a zatim površinski sterilisani. Po sterilizaciji, svaki plod je ozleđen tako što su na njemu napravljeni ujednačeni otvori prečnika 3 mm i dubine 4 mm.

U pripremljena udubljenja mikropipetom je uneto po 2 µl pripremljene kultivacione tečnosti. Nakon 10 minuta u otvore ploda su postavljeni fragmenti micelije izolata zajedno sa podlogom (prečnika 3 mm). Kontrola je tretirana sterilnom, destilovanom vodom, a potom su uneti fragmenti micelije. Za potrebe negativne kontrole, korišćeni su plodovi ozleđeni na isti način, u ozlede je uneta sterilna, destilovana voda, ali nije izvršena inokulacija.

Inokulisani plodovi su inkubirani u plastičnom kontejneru postavljenom u laboratoriji pri sobnoj temperaturi (21-23°C) i prirodnim uslovima smene dana i noći, dok su uslovi visoke relativne vlažnosti obezbeđeni u samom kontejneru. Inkubacija je trajala 10 dana. Po isteku inkubacije, meren je prečnik razvijene nekroze na tretiranim i kontrolnim plodovima.

#### 4.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati ostvareni u *in vitro* testovima izvedeni su u tri ponavljanja pod identičnim uslovima, a dobijeni rezultati prikazani su kao srednje vrednosti sa standardnim odstupanjima. Statistička analiza u svim eksperimentima izvršena je pri nivou značajnosti od 0,05.

U oglecima koji su za cilj imali poređenje aktivnosti *S. hygrosopicus* sa drugim potencijalnim antagonistima, statistička obrada eksperimentalnih rezultata izvršena je primenom softverskog paketa Statistica 13.0 (Dell Inc., USA) primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA). Naknadnim (post-hoc) testiranjem primenom Dankanovog (Duncan) testa višestrukih poređenja utvrđene su homogene grupe i značajnost razlika između srednjih vrednosti grupa u okviru svake od analiziranih kombinacija.

Rezultati eksperimenta koji je za cilj imao odabir optimalnog izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* obrađeni su primenom softverskog paketa Statistica 13.0, primenom jednofaktorijalne analize varijanse, a naknadnim post-hoc testiranjem primenom Dankanovog testa utvrđene su homogene grupe te je u okviru svake od analiziranih kombinacija utvrđena značajnost razlika između srednjih vrednosti grupa.

Statistička obrada eksperimentalnih rezultata i matematičko modelovanje u ogledima koji su za cilj imali optimizaciju količina odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus*, izvršeno je primenom softverskog paketa Statistica 13.0. Za optimizaciju parametara, odnosno faktora, korišćena je metoda željene funkcije u softverskom paketu Design Expert 8.1. (Stat-Ease, Inc., USA). U ove svrhe korišćen je Boks-Benkenov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački (tabela 4.4). Oznakom "X" označene su nezavisne promenljive odnosno faktori varirani u eksperimentu. Svaki od faktora variran je kao najmanja, srednja i najveća vrednost u skladu sa odabranim eksperimentalnim planom. Od faktora ispitivani su količina glicerola, X1 (5-20 g/l), količina (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, X2 (0,25-0,75 g/l) i K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, X3 (1-3 g/l). Oznakom "Y" označene su zavisne promenljive odnosno vrednosti dobijenih odziva. Kao odzivi odabrani su sadržaj rezidualnog glicerola (Y1, g/l), sadržaj rezidualnog azota (Y2, g/l), sadržaj rezidualnih fosfata (Y3, g/l), prečnik zone inhibicije na test izolat *A. alternata* KA10 (Y4, mm), prečnik zone inhibicije na test izolat *A. alternata* T1Jg3 (Y5, mm), prečnik zone inhibicije na test izolat *F. avenaceum* KA12 (Y6, mm) i prečnik zone inhibicije na test izolat *F. avenaceum* KA13 (Y7, mm).

Za definisanje optimalne brzine mešanja i optimalnog intenziteta aeracije u laboratorijskom bioreaktoru radne zapremine 3 l, korišćen je eksperimentalni plan koji obuhvata pun faktorijalni dizajn 3<sup>3</sup> sa tri ponavljanja u centralnoj tački. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata i matematičko modelovanje izvršeno je primenom softverskog paketa Statistica 13.0. dok je za optimizaciju parametara, odnosno faktora, korišćena metoda željene funkcije u softverskom paketu Design Expert 8.1. Od faktora su ispitani brzina mešanja, X1 (100-300 o/min), intenzitet aeracije, X2 (0,5-1,5 l/l/min) i vreme kultivacije u kome je uočena maksimalna produkcija željenih antagonističkih agenasa, X3 (96-144 h). Kao odzivi odabrani su sadržaj rezidualnog glicerola (Y1, g/l), sadržaj rezidualnog azota (Y2, g/l), sadržaj suve materije (Y3, g/l), sadržaj rezidualnih fosfata (Y4, g/l), prečnik zone inhibicije na test izolat *A. alternata* T1Jg3 (Y5, mm), prečnik zone inhibicije na test izolat *A. alternata* KA10 (Y6, mm), prečnik zone inhibicije na test izolat *F. avenaceum* KA13 (Y7, mm) i prečnik zone inhibicije na test izolat *F. avenaceum* KA12 (Y8, mm).

Rezultati eksperimenata u kojima je izvršena optimizacija količina ugljenika, azota i fosfata i optimizacija procesnih parametara fitovani su polinomom drugog reda:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_{ii}^2 + \sum b_{ij} X_{ij}$$

gde su:

$Y$  – odzivna funkcija,

$X_i$  – ispitivani faktori,

$b_0$  – odsečak,

$b_i$  – linearni koeficijenti,

$b_{ii}$  – kvadratni koeficijenti i

$b_{ij}$  – koeficijenti interakcije regresione jednačine.

Uspešnost fitovanja eksperimentalnih rezultata polinomom drugog reda procenjena je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), dok je značajnost modela utvrđena pomoću  $t$  i  $p$ -vrednosti. Značajnost uticaja pojedinačnih faktora kao i njihova interakcija procenjena je preko  $p$ -vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini.



## **5. REZULTATI I DISKUSIJA**

---

## 5.1. PRIKUPLJANJE I IZOLACIJA PATOGENA

Uzorci plodova jabuke sa simptomima truleži sakupljeni su tokom 2012. godine na teritoriji Republike Srbije iz ULO hladnjača i uzorkovani po iznošenju iz komore. Plodovi su birani vizuelnim pregledom na osnovu prisustva simptoma truleži.

Po izolaciji iz uzorkovanih plodova izabrano je 30 izolata koji su presejani na PDA podlogu i dobijene su čiste kulture. Među dobijenim čistim kulturama, vizuelnim pregledom i mikroskopiranjem izdvojeni su izolati koji su po morfološkim karakteristikama odgovarali rodovima *Alternaria* i *Fusarium* (ukupno 15 izolata) sačinjeno je sedam monosporijalnih izolata *Alternaria* spp. i osam monosporijalnih izolata *Fusarium* spp. Za sve monosporijalne izolate je potvrđena patogenost na plodovima jabuke, – veštačkom inokulacijom su reprodukovani simptomi truleži karakteristični za *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. Iz veštački inokulisanih plodova je izvršena reizolacija. Utvrđeno je da izgled kolonija dobijenih reizolata u potpunosti odgovara izgledu kolonija izvornih izolata i potvrđena je patogenost svih 15 reizolata. Na kontrolnim, nezaraženim plodovima nije došlo do pojave simptoma bolesti.

Po dokazanoj patogenosti, odabrano je dva izolata *Alternaria* sp. (KA10 i T1Jg3) i *Fusarium* sp. (KA12 i KA13) za koje je sprovedena identifikacija do nivoa vrste primenom molekularnih metoda i koji su u daljim istraživanjima korišćeni kao test organizmi. Izolati su prekulivisani na kosu PDA podlogu i čuvani su u frižideru na temperaturi od 3-4°C. Ovako formirane kolekcije *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. presejavana je na svakih šest meseci.

## 5.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLOVANIH PATOGENA

Nakon uspešne ekstrakcije DNK ispitivanih izolata, molekularnom analizom identifikovana su dva izolata roda *Alternaria* i dva izolata roda *Fusarium*.

### 5.2.1. KLONIRANJE SEKVENCI rDNK-ITS REGIONA

ITS region ribozomalne DNK amplifikovan je primenom prajmera ITS1 i ITS4. Dobijeni amplifikovani produkti *Alternaria* spp. izolata bili su veličine oko 600 bp dok su za *Fusarium* spp. bili veličine između 500-600 bp (Ristić dr, 2012; Ristić i sar 2014).

### 5.2.2. ANALIZA SEKVENCI

Na osnovu ClustalW programa, u okviru programskog paketa BioEdit utvrđeno je da su pikovi dobijenih sekvenci dobro vidljivi i da ne dolazi do njihovog međusobnog

preklapanja, te je zaključeno da su sekvence dobrog kvaliteta i da se može pristupiti njihovoj analizi.

BLAST analiza sekvenci fragmenata *Alternaria* izolata pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama vrste *A. alternata* deponovanih u GenBank bazi podataka, dok je analizom sekvenci fragmenata *Fusarium* izolata BLAST analiza pokazala 100% identičnosti sa vrstom *F. avenaceum*. Utvrđeno je da izolati KA10 i T1Jg3 pripadaju vrsti *A. alternata*, a izolati KA12 i KA13 vrsti *F. avenaceum*.

### 5.3. POREĐENJE PROIZVODNE SPOSOBNOSTI *S. hygroscopicus* SA DRUGIM POTENCIJALNIM PRODUCERIMA ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

U ovoj fazi istraživanja izvršeno je ispitivanje proizvodne sposobnosti *S. hygroscopicus* na podlozi čiji je sastav isti kao u podlozi za osvežavanje i umnožavanje proizvodnog mikroorganizma i poređenje njegove aktivnosti sa drugim potencijalnim producerima antagonista skladišnih patogena jabuke.

Kao produceri antagonista skladišnih patogena jabuke, pored *S. hygroscopicus*, odabrani su mikroorganizmi koji se u naučnoj literaturi navode kao potencijalni antagonisti ispitivanih rodova *Alternaria* i *Fusarium*. *Leuconostoc mesenteroides* odabran je kao jedan od mogućih producera zbog njegovog potencijala u kontroli *F. oxysporum* (Zebboudj i sar., 2014). Sa druge strane, istraživanja Singh i Deverall potvrđuju da bakterije roda *Bacillus* pokazuju potencijal u delovanju na fitopatogene gljive iz roda *Alternaria* (Singh i Deverall, 1984), dok su El-Sayed Shalaby i Fathi El-Nady u svojim istraživanjima potvrdili da *Saccharomyces cerevisiae* može biti iskorišćen u kontroli bolesti izazvanih *Fusarium* vrstama (El-Sayed Shalaby i Fathi El-Nady, 2008).

Tabela 5.1. Dvofaktorijalna analiza varijanse inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) i *F. avenaceum* (KA12 i KA13)

Izvor variranja	SS-suma kvadrata	Df-stepeni slobode	MS-sredina kvadrata	F-vrednost	$p$ -vrednost
Antagonista	8331,100	4	2082,775	8926,18	0,00**
Patogen	32,200	3	10,733	46,00	0,00**
Antagonista*Patogen	3303,300	12	275,275	1179,75	0,00**
Greška	9,333	40	0,233		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Rezultati delovanja ispitivanih mikroorganizama na rast micelije *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) i *F. avenaceum* (KA12 i KA13) obrađeni su dvofaktorijalnom analizom varijanse (tabela 5.1).

Kao što pokazuju rezultati prikazani u tabeli 5.1., variranja inhibicije rasta micelije nastaju kao posledica aktivnosti različitih antagonista, različite osetljivosti ispitanih skladišnih

patogena, kao i interakcije između ova dva faktora. Međutim, najveći izvor varijacije prečnika zona inhibicije je svakako aktivnost različitih antagonista.

Tabela 5.2. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije ( $\pm$ Sd) izolata *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) i *F. avenaceum* (KA12 i KA13) prouzrokovane delovanjem ispitanih mikroorganizama

Antagonista	Test patogen	Prečnik zone inhibicije (mm) $\pm$ Sd
<i>S. hygroscopicus</i>	KA10 ( <i>A. alternata</i> )	35,67 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>
	T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )	33,0 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
	KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )	33,67 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>
	KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	26,67 $\pm$ 0,58 <sup>c</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	KA10 ( <i>A. alternata</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )	20,0 $\pm$ 0,00 <sup>g</sup>
	KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	24,33 $\pm$ 0,58 <sup>e</sup>
<i>B. cereus</i>	KA10 ( <i>A. alternata</i> )	25,33 $\pm$ 1,73 <sup>d</sup>
	T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )	22,0 $\pm$ 0,00 <sup>f</sup>
	KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
<i>L. mesenteroides</i>	KA10 ( <i>A. alternata</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
Control	KA10 ( <i>A. alternata</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
	KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>

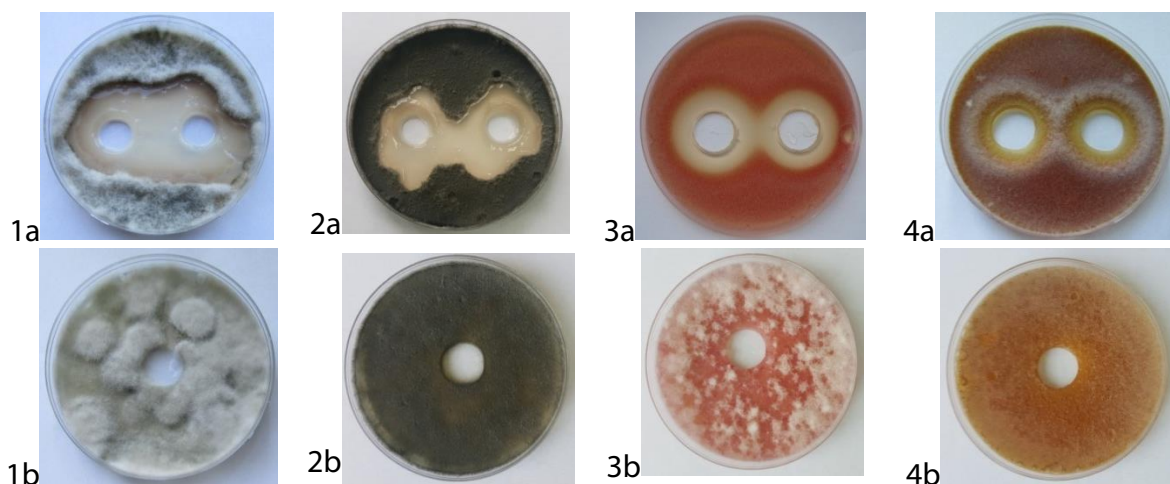
\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; ( $\pm$ Sd) –standardna devijacija

Dankanovim testom (tabela 5.2.) utvrđeno je da *S. hygroscopicus* uzrokuje statistički značajno veću inhibiciju rasta micelije sva četiri testirana izolata u odnosu na ostale ispitane mikroorganizme i kontrolu (Grahovac i sar., 2014). S obzirom da je prečnik zone inhibicije veći od 22 mm ukazuje da je primenjeno sredstvo protiv fitopatogenih gljiva visoko efikasno, možemo zaključiti da primenjeni proizvodni mikroorganizam *S. hygroscopicus* daje zone koje su daleko iznad ove vrednosti kod sva četiri test izolata (Shimizu i sar., 2009).

Posmatrajući nivoe značajnosti može se zaključiti da izolat *A. alternata* KA10 pokazuje najveću osetljivost na testirani mikroorganizam *S. hygroscopicus* što se može uočiti i sa Slike 5.1. (1a), zatim slede *A. alternata* T1Jg3 i *F. avenaceum* KA12 dok izolat *F. avenaveum* KA13 pokazuje najmanju zonu inhibicije rasta micelije u odnosu na ostala tri izolata (slika 5.1. (4a)).

Rezultati dati u Tabeli 5.2. pokazuju da *L. mesenteroides* ne ispoljava inhibitorno delovanje na rast micelije izolata *A. alternata* i *F. avenaceum*. Dakle, postojeći izolat *L. mesenteroides* nije pogodan antagonista u kontroli skladišnih patogena roda *Fusarium* iako su neki naučnici, sa drugim izolatima ove vrste, ostvarili zadovoljavajuću inhibiciju (Zebboudj i sar., 2014).

S druge strane, primenom *B. cereus* postiže se inhibicija rasta micelije izolata vrste *A. alternata* koja je statistički značajna u odnosu na kontrolu, ali na statistički značajno nižem nivou od *S. hygrosopicus*. Takođe, *S. cervisae* pokazuje delovanje na izolate roda *Fusarium* dok delovanje na izolate roda *Alternaria* nije uočeno.



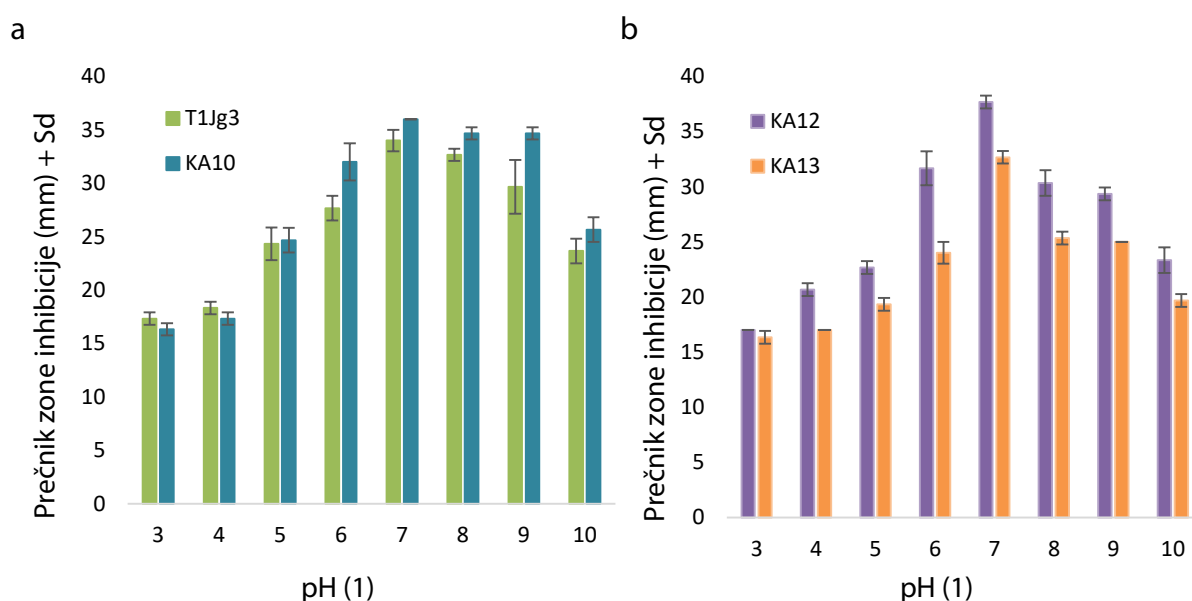
Slika 5.1. Inhibicija rasta micelije primenom *S. hygrosopicus* (a) i kontrola(b)  
 (1) *A. alternata* KA10; (2) *A. alternata* T1Jg3; (3) *F. avenaceum* KA12; (4) *F. avenaceum* KA13

Na slici 5.1. prikazane su zone inhibicije nastale delovanjem *S. hygrosopicus* na sva četiri test izolata kao i kontrolne Petri ploče gde je kao kontrola korišćena sterilna destilovana voda.

Analizom dobijenih rezultata potvrđeno je da *S. hygrosopicus* ima najveći potencijal kao antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*, te je u daljem istraživanju korišćen kao proizvodni mikroorganizam u proizvodnji antifungalnih agenasa namenjenih za kontrolu skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*.

#### 5.4. UTICAJ VREDNOSTI pH NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Kako bi izvršili odabir optimalne vrednosti pH podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus* a sa ciljem dobijanja antifungalnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*, izvršeno je ispitivanjem osam nezavisnih kultivacija sa različitim početnim vrednostima pH podloge koji su varirani u intervalu od 3 do 10 pH jedinica sa odstupanjem  $\pm 0,1$ . Kultivacije su izvedene na podlozi za biosintezu *S. hygroscopicus* na  $27\pm 1^\circ\text{C}$  tokom 7 dana, a za mešanje i aeraciju kultivacione tečnosti korišćena je rotaciona tresilica sa brzinom mešanja 150 o/min.



Slika 5.2. Uticaj vrednosti pH podloge na produkciju antagonista skladišnih patogenata jabuke primenom *S. hygroscopicus* na izolate: *A. alternata* (a) i *F. avenaceum* (b)

Dobijeni rezultati prikazani na slici 5.2. ukazuju da *S. hygroscopicus* pokazuje veoma dobru produkciju antifungalnih agenasa kada je vrednost pH podloge veća od 5. Nešto veća zona inhibicije nastaje kod test izolata *A. alternata* KA10 dok je izolat *A. alternata* T1Jg3 nešto manje osetljiv na produkovane antagonističke agense. S druge strane, kada se posmatraju izolati vrste *F. avenaceum*, može se zaključiti da je izolat KA12 osetljiviji u odnosu na izolat KA13.

Statističkom obradom podataka (rezultati nisu prikazani) utvrđeno je da vrednost pH podloge značajno utiče na prečnik zone inhibicije rasta micelije sva četiri testirana izolata, a Dankanovim testom utvrđene su razlike u značajnosti uticaja inicijalnih vrednosti pH podloge na produktivnost *S. hygroscopicus*.

Posmatrajući uticaj vrednosti pH podloge na test izolat *A. alternata* KA10, može se zaključiti da se na istom nivou značajnosti nalaze podloga čije su se inicijalne vrednosti pH kretale u

intervalu od 6 ( $p=0,00001$ ) do 9 ( $p=0,000008$ ), te je proizvodnja željenih antagonističkih agenasa na ovim podlogama bila najuspešnija. U slučaju izolata *A. alternata* T1Jg3, na istom nivou značajnosti sa prethodnim izolatom nalaze se podloge sa inicijalnim vrednostima pH 7 ( $p=0,000008$ ) i 8 ( $p=0,000008$ ) pri čemu su dobijene zone inhibicije rasta micelije 34 mm i 32,67 mm, respektivno. Analizom dobijenih rezultata za izolate vrste *A. alternata* može se zaključiti da kod oba izolata figurišu vrednosti pH podloge 7 i 8 kao najbolje za produkciju željenih antagonističkih agenasa.

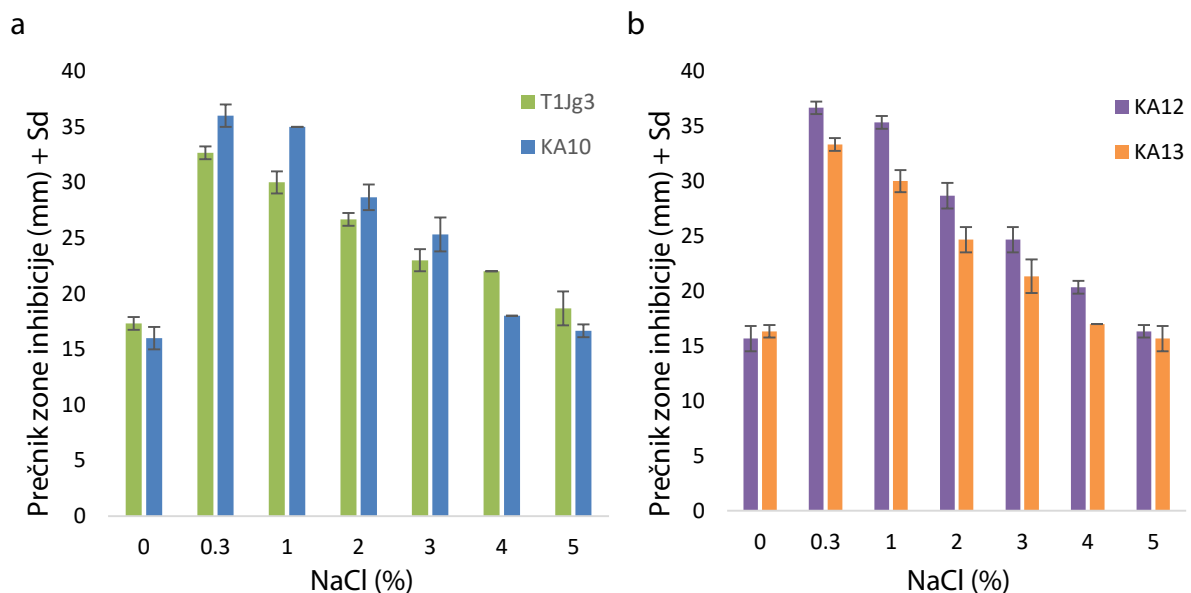
U slučaju izolata vrste *F. avenaceum*, rezultati dobijeni statističkom obradom pokazuju da izolat *F. avenaceum* KA12 pokazuje najveću osetljivost kada se primeni podloga za kultivaciju *S. hygroscopicus* sa početnom vrednosti pH 7 ( $p=0,000007$ ), pri čemu se formira prečnik zone inhibicije od 37,67 mm. Za razliku od ovog izolata, izolat *F. avenaceum* KA13 je nešto otporniji na produkovane antagonističke agense i formira srednji prečnik zone inhibicije 32,67 mm pri inicijalnoj vrednosti pH podloge 7 ( $p=0,000008$ ). Rezultati pokazuju da se najveći prečnik zone inhibicije rasta micelije oba izolata vrste *F. avenaceum* formira kultivacijom *S. hygroscopicus* na podlozi sa inicijalnom vrednosti pH 7.

U skladu sa dobijenim rezultatima, za produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum* primenom proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus* najpogodnija je neutralna sredina, te je u nastavku istraživanja korišćena podloga sa vrednosti pH  $7\pm 0,1$ , a naučno dostupna literatura potvrđuje činjenicu da testirani *Streptomyces* izolati pokazuju najbolju produkciju željenih agenasa na podlogama sa inicijalnim vrednostima pH 7 i 8 (James i sar., 1991; Mangamuri i sar., 2014; Kontro i sar., 2005).

## 5.5. UTICAJ OSMOTSKOG PRITISKA NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Poznato je da uslovi sredine u kojima se bakterije nalaze, značajno utiču na njihov rast, razmnožavanje i produkciju željenih metabolita. Održavanje strukture i metabolizma bakterijskih ćelija omogućeno je osmoregulatornim procesima. Nagle promene osmotskog pritiska mogu dovesti do narušavanja fosfolipidne strukture ćelijske membrane koja može za posledicu imati smrt ćelije (Sochocka i Boratyński, 2011). Naime, ako se ćelija nalazi u hipertoničnom rastvoru (sa visokim sadržajem rastvora kao što su soli, šećer ili drugi minerali), ćelija možda neće biti u stanju da preživi višak pritiska i može biti podvrgnuta plasmolizi (pucanje ćelije) zbog uzimanja višak vode. U drugom slučaju, ako se ćelija nalazi u hipotoničnom rastvoru (sa niskim sadržajem rastvora poput soli, šećera ili drugih minerala), ćelija prolazi kroz process skupljanja zbog gubitka viška vode. Dakle, poznavanje uticaja osmotskog pritiska na mikrobiološke ćelije i regulisanje njegove aktivnosti dovelo je do mogućnosti upotrebe bakterija u biotehnologiji.

U okviru ovih istraživanja, ispitivanje uticaja različitih vrednosti osmotskog pritiska na produktivnost proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus* izvršeno je primenom različitih koncentracija soli NaCl. Uticaj osmotskog pritiska na produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke ispitana je u setu eksperimenata sa različitim koncentracijama NaCl koje su varirane u intervalu od 0 do 5% (Singh i sar., 2009; Ripa i sar., 2009). Kultivacije sedam nezavisnih eksperimenata sa različitim inicijalnim sadržajem NaCl izvedene su na podlozi za biosintezu *S. hygroscopicus*, tokom 7 dana, na  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , sa eksternim mešanjem na rotacionoj tresilici.



Slika 5.3. Uticaj vrednosti osmotskog pritiska na produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus* na izolate *A. alternata* (a) i *F. avenaceum* (b)

Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički visoko značajna razlika u produktivnosti *S. hygroscopicus* na podlogama sa različitim osmotskim pritiskom i da upravo primena zaličitih koncentracija soli NaCl u podlozi predstavlja najveći izvor varijacija prečnika zona inhibicije rasta micelije sva četiri testirana fitopatogena izolata (rezultati nisu prikazani). Dankanovim testom dobile su se detaljnije informacije o nivoima značajnosti uticaja različitih koncentracija soli u podlozi na proizvodnju željenih antagonističkih agenasa efikasnih na četiri test izolata.

Posmatrajući sliku 5.3., zapaža se da koncentracije NaCl od 0,3% i 1% daju najbolje zone inhibicije rasta micelije kod sva četiri testirana izolata. Statističkom obradom utvrđeno je da najveći prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 nastaje primenom podloga za kultivaciju *S. hygroscopicus* koje sadrže 0,3% ( $p=0,000012$ ) i 1% ( $p=0,000019$ ) NaCl, pri čemu se ove dve vrednosti nalaze na višem nivou značajnosti od drugih primenjenih koncentracija soli. U slučaju izolata *A. alternata* T1Jg3, podloga za kultivaciju *S. hygroscopicus* sa sadržajem NaCl od 0,3% ( $p=0,000018$ ) nalazi se na najvišem nivou



značajnosti formirajući prečnik zone inhibicije rasta micelije od 32,67 mm. Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da je primena koncentracije soli NaCl od 0,3% za kultivaciju *S. hygroscopicus* u cilju dobijanja željenih antagonističkih agenasa, optimalno rešenje. Dobijeni rezultati poklapaju se sa rezultatima Ripa i saradnika koji su utvrdili da od svih ispitivanih koncentracija NaCl u podlozi za proizvodnju sekundarnih metabolita primenom *Streptomyces* sp. koncentracija od 0,5% i 1% pokazuju maksimalnu produkciju željenih agenasa (Ripa i sar., 2009).

Rezultati ostvareni testiranjem izolata vrste *F. avenaceum* veoma su slični. Naime, najveći prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 nastaje kultivacijom *S. hygroscopicus* na podlozi sa inicijalnim koncentracijama soli 0,3% ( $p=0,000012$ ) i 1% ( $p=0,00012$ ). Ove dve koncentracije nalaze se na istom nivou značajnosti formirajući maksimalne prečnike zona inhibicije od 36,67 mm i 35,33 mm, respektivno. U slučaju izolata *F. avenaceum* KA13, podloga za kultivaciju *S. hygroscopicus* sa 0,3% ( $p=0,000019$ ) NaCl u podlozi dala je najveće prečnike zona inhibicije rasta micelije ovog izolata od 33,33 mm. Ova koncentracija soli nalazi se na višem nivou značajnosti u odnosu na sve ostale primenjene koncentracije. Dakle, posmatrajući rezultate dobijene za izolate vrste *F. avenaceum*, može se uočiti da je koncentracija NaCl u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* u cilju dobijanja željenih antagonističkih agenasa, optimalno rešenje (Ripa i sar., 2009).

U skladu sa ostvarenim rezultatima koji su u saglasnosti sa rezultatima iz naučno dostupne literature, može se zaključiti da je za produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus* najpogodnija podloga koja sadrži 0,3% NaCl, te je ova koncentracija NaCl korišćena u nastavku istraživanja.

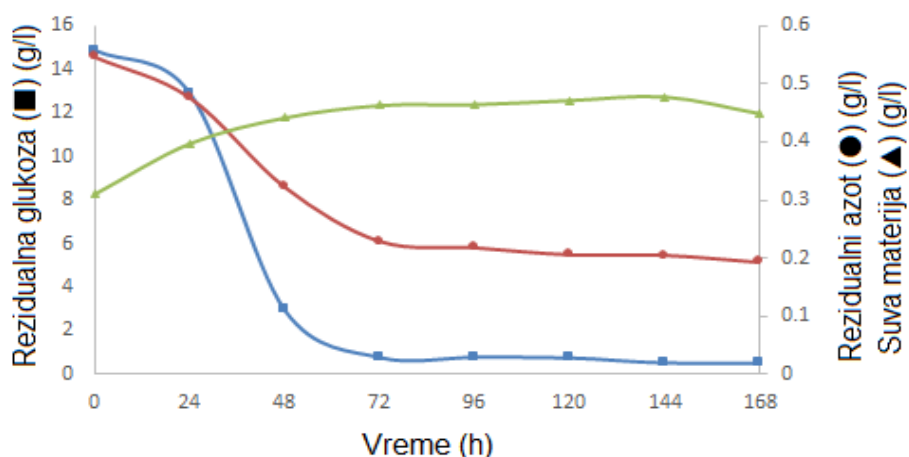
## **5.6. UTICAJ DUŽINE TRAJANJA KULTIVACIJE NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE**

Poznato je da je prilikom izvođenja bioprocesa dužina njegovog trajanja značajan parametar koji je neophodno optimizovati kako bi se uvećala tehno-ekonomska isplativost. Optimalna dužine trajanja kultivacije sa ciljem proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke bi podrazumevala najkraće vreme vođenja bioprocesa u kojem se dobijaju maksimalne moguće količine ciljanih antagonističkih agenasa. Zbog svega navedenog, cilj ove faze istraživanja bio je da se ispita uticaj dužine trajanja kultivacije na pokazatelje toka proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke u laboratorijskom bioreaktoru i da se utvrdi vreme u kome dolazi do maksimalne produkcije antagonističkih agenasa efikasnih protiv četiri skladišna patogena vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*.

U okviru ovih istraživanja korišćena je podloga za umnožavanje proizvodnog mikroorganizma (tabela 4.3.), a kultivacija je izvedena u trajanju od 7 dana u laboratorijskom

bioreaktoru pod tačno definisanim uslovima koji su podrazumevali temperaturu od 27 °C, brzinu mešanja 200 o/min i intenzitet aeracije 0,5 l/l/min. Slične uslove kultivacije primenili su Techapun i saradnici u istraživanju sa *Streptomyces* sp. Ab 106. Oni su primetili da velike brzine mešanja (veće od 250 obrtaja u minuti) dovode do razaranja ćelija i smanjenja prinosa proizvoda te da su optimalne brzine mešanja između 150 i 200 o/min (Techapun i sar, 2003).

Kako bi se ispitao tok kultivacije i utvrdilo vreme u kome dolazi do maksimalne produkcije željenih antagonističkih agenasa, uzorci kultivacione tečnosti uzorkovani su i testirani na svaka 24 h tokom 7 dana kultivacije *S. hygroscopicus*.



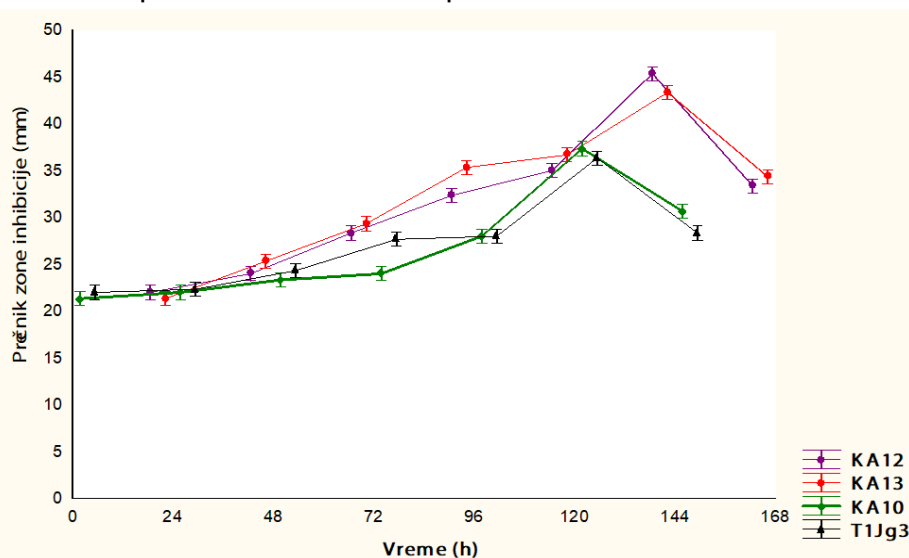
Slika 5.4. Promena sadržaja glukoze, ukupnog azota i suve materije tokom 7 dana kultivacije *S. hygroscopicus* u laboratorijskom bioreaktoru

Na slici 5.4. prikazan je tok potrošnje dva najvažnija nutrijenta i promena sadržaja suve materije koja je indirektni pokazatelj sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma tokom 7 dana kultivacije *S. hygroscopicus* u laboratorijskom bioreaktoru. U ovom istraživanju kao izvor ugljenika korišćena je glukoza u količini 15 g/l. Singh i saradnici su potvrdili da ova koncentracija glukoze omogućava najveći rast i proizvodnju antimikotika primenom *Streptomyces* sp. A2D (Singh i sar., 2009). Rezultati pokazuju da se posle 48 h kultivacije sadržaj glukoze značajno smanjio što je bilo očekivano s obzirom da mikroorganizam koristi ovaj nutrijent u eksponencijalnoj fazi za rast i razmnožavanje. Intenzivna potrošnja glukoze završava se oko trećeg dana kultivacije kada nastupa faza u kojoj se glukoza i dalje troši, ali smanjenom brzinom. U trećem danu kultivacije, sadržaj glukoze imao je vrednost 0,78 g/l da bi do kraja bioprocesa ta vrednost opala na 0,51 g/l.

Ukupan sadržaj azota smanjuje se tokom bioprocesa što je prikazano na slici 5.4. Kao što je slučaj i sa glukozom, tokom eksponencijalne faze rasta primećuje se intenzivna potrošnja azota što ukazuje da mikroorganizam koristi izvor azota za sintezu aminokiselina i proteina koji su ćelijski konstituenti. Budući da se sporija potrošnja azota nastavlja do kraja trajanja

bioprocesa, a da sojino brašno sadrži veliki broj aminokiselina, među kojima su najvažnije asparagin, glutamin, leucin, arginin, lizin i serin (Portera i Jonesb, 2003), može se pretpostaviti da su upravo neke od ovih kiselina ključni donori azota za biosintezu antifungalnih jedinjenja.

Dobijeni rezultati pokazuju da je intenzivna potrošnja oba nutrijenta usko povezana sa porastom biomase ćelija proizvodnog mikroorganizma tokom kultivacije i ona nam, kao indirektan pokazatelj, pokazuje da eksponencijalna faza rasta traje do trećeg dana kultivacije kada nastupa stacionarna faza bioprocesa.



Slika 5.5. Promena srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije četiri izolata skladišnih patogena tokom 7 dana kultivacije

Ispitivanjem delovanja supernatanta kultivacione tečnosti i termički tretiranog supernatanta kultivacione tečnosti u *in vitro* ogledima na četiri skladišna patogena, utvrđeno je da termički tretirani supernatant kultivacione tečnosti tokom 7 dana kultivacije ne pokazuje delovanje na testirane fitopatogene izolate, što ukazuje da je aktivna komponenta sa antifungalnim delovanjem termolabilna. Slične rezultate dobili su Prapagdee i saradnici u svom istraživanju zaključivši da antifungalni potencijal supernatanta kultivacione tečnosti potiče od delovanja termolabilnih proteina kao što su ekstracelularni hidrolitički enzimi (Prapagdee i sar., 2008a). Sa druge strane, netretirani supernatant kultivacione tečnosti pokazao je delovanje na sva četiri ispitivana izolata skladišnih patogena rodova *Alternaria* i *Fusarium* tokom 7 dana kultivacije *S. hygroscopicus* (slika 5.5).

Kao što je očekivano, vreme kultivacije statistički značajno utiče na produkciju željenih antagonističkih agenasa odnosno, postoji statistički značajna razlika u prečnicima zona inhibicije rasta micelije između svakog dana kultivacije (tabela 5.3). Takođe, statistički značajne razlike primećuju se i između formiranih prečnika zona inhibicije svakog od ispitivanih fitopatogenih izolata, kao i kod interakcije između ova dva faktora (patogen i

vreme kultivacije). Međutim, najveći izvor varijacija zona inhibicije pokazao je uticaj vremena kultivacije.

Tabela 5.3. Rezultati faktorijalne analize varijanse: izvori varijacije zona inhibicije nakon 72 h inkubacije na 27°C

Izvor variranja	SS-suma kvadrata	Df-stepeni slobode	MS-sredina kvadrata	F-vrednost	<i>p</i> -vrednost
Patogen	394,36	3	131,45	307,8	0,00**
Vreme kultivacije (h)	3041,66	7	434,52	1017,4	0,00**
Patogen*Vreme	766,55	21	36,5	85,5	0,00**
Greška	27,33	64	0,43		

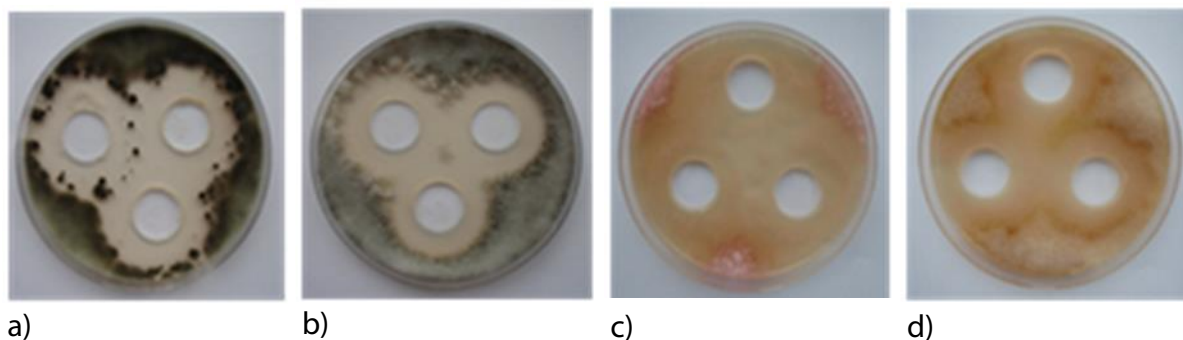
Na osnovu rezultata Dankanovog testa višestrukog poređenja (tabela 5.4.) može se zaključiti da vreme kultivacije ima značajan uticaj ( $p \leq 0,01$ ) na produkciju željenih antagonističkih agenasa.

U skladu sa navodima Shimizu i saradnika da svaki poluprečnik zone inhibicije veći od 11 mm ukazuje da je primenjeno sredstvo visokoefikasno (Shimizu i sar., 2009), može se zaključiti da proizvodni mikroorganizam *S. hygrosopicus* proizvodi potencijalno visokoefikasne antifungalne metabolite. Sa slike 5.5. može se uočiti da do porasta produkcije željenih antagonističkih agenasa dolazi nakon trećeg dana kultivacije, a da se maksimalni prečnici zona inhibicije izolata *A. alternata* KA10 (38 mm) i T1Jg3 (37 mm) formiraju u 120 h kultivacije, dok se kod izolata *F. avenaceum* KA12 (42 mm) i KA13 (40 mm) formiraju tokom 144 h kultivacije. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima u kome su Kyu-Sang i saradnici zaključili da ispitivane *Streptomyces* vrste mogu da proizvedu više od jednog metabolita aktivnog protiv različitih fitopatogenih gljiva (Kyu-Sang i sar., 2014). Osim toga, naše istraživanje pokazuje da u primenjenim eksperimentalnim uslovima, *S. hygrosopicus* verovatno proizvodi više od jednog bioaktivnog metabolita koji imaju različit uticaj na inhibitorno delovanje supernatanta kultivacione tečnosti

Tabela 5.4. Dankanov test višestrukih poređenja: srednje vrednosti prečnika zona inhibicije rasta micelije tokom sedam dana kultivacije

Vreme kultivacije (h)	Srednja vrednost prečnika zone inhibicije (mm)
0	21,25 <sup>b a</sup>
24	21,95 <sup>b</sup>
48	24,25 <sup>c</sup>
72	27,33 <sup>d</sup>
168	28,83 <sup>e</sup>
96	30,92 <sup>f</sup>
120	36,33 <sup>g</sup>
144	36,92 <sup>h</sup>

Na slici 5.6. prikazani su maksimalni prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata vrste *A. alternata* i *F. avenaceum* formirani delovanjem 100 µl supernatanta *S. hygrosopicus* nakon 72 h inkubacije na 27°C. Svi izolati su tretirani supernatantom kultivacione tečnosti *S. hygrosopicus*.



Slika 5.6. Maksimalni prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 (a), *A. alternata* T1Jg3 (b), *F. avenaceum* KA12 (c) i *F. avenaceum* KA13 (d) formirani delovanjem 100 µl supernatanta *S. hygrosopicus* nakon 72 h inkubacije

Posmatrajući tok kultivacije i produkciju željenih antagonističkih agenasa može se zaključiti da stacionarna faza rasta počinje između trećeg i četvrtog dana kultivacije i da se već tokom četvrtog dana formiraju značajni prečnici zona inhibicije rasta micelije testiranih skladišnih patogena, što ukazuje na mogućnost značajnog skraćanja trajanja bioprocasa čime bi se uvećala efikasnost bioprocasa sa tehno-ekonomskog aspekta.

## 5.7. ODABIR OPTIMALNIH IZVORA UGLJENIKA I AZOTA U PODLOZI ZA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Dobro je poznato da je formiranje odgovarajućeg kultivacionog medijuma preduslov za dobijanje visokih prinosa željenih agenasa. Variranjem dva najvažnija nutrijenta u podlozi za rast i kultivaciju proizvodnog mikroorganizma, ugljenika (C) i azota (N), možemo značajno da utičemo na stimulaciju produkcije antagonista skladišnih patogena jabuke. S obzirom da je poznato da su za rast, razmnožavanje, ali i za produkciju sekundarnih metabolita primenom bakterija roda *Streptomyces* neophodna ova dva nutrijenta (Gesheva i sar., 2005; Ripa i sar., 2009; Singh i sar., 2009), cilj ove faze istraživanja bio je upravo ispitivanje njihovog uticaja na produkciju skladišnih patogena jabuke efikasnih na izolate vrste *A. alternata* i *F. avenaceum*.

Iako svaki nutrijent ponaosob ima uticaj na produkciju željenih metabolita, kada se govori o uticaju ugljenika i azota neophodno je uzeti u obzir i njihov međusobni uticaj (Ripa i sar., 2009; Grahovac i sar., 2014; Wu i sar., 2008; Singh i sar., 2008). Ovo je veoma važno s obzirom

da tačan sastav organskih izvora azota (sojino brašno, ekstrakt kvasca...) nije u potpunosti poznat te oni u svom sastavu mogu da sadrže i ugljenik. Podaci o odgovarajućoj kombinaciji izvora ugljenika i azota u podlozi za rast i kultivaciju proizvodnog mikroorganizma daje nam podatke o prinosu ali i o mogućnosti primene pojedinih otpadnih tokova. Dakle, na osnovu odabranih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju, može se izvršiti odabir otpadne vode sa najslabijim sastavom koja bi potencijalno bila adekvatna zamena. Ovo je veoma važno sa ekonomskog aspekta jer je za proizvodnju visokovrednih proizvoda primenom proizvodnih mikroorganizama veoma bitno da kultivacioni medijum sadrži nutrijente lako dostupne na tržištu i, ukoliko je moguće, što jeftinije (Ortiz i sar., 2007).

U cilju ispitivanja produkcije antifungalnih agenasa primenom *S. hygrosopicus*, izvršena je kultivacija proizvodnog mikroorganizma u erlenmajerima na podlogama sa različitim kombinacijum izvora ugljenika i azota. Ispitano je šest izvora ugljenika koji predstavljaju najvažnije monosaharide (glukoza i fruktoza), disaharide (laktoza i maltoza), polisaharid (skrob) i alkohol (glicerol) (Gesheva i sar., 2005; Ripa i sar., 2009). Svi izvori ugljenika su kombinovani u pet eksperimenata sa izvorima azota, pri čemu su četiri eksperimenata sadržala azot (sojino brašno, ekstrakt kvasca, pepton i NaNO<sub>3</sub>) dok je peti eksperiment bio bez dodatog izvora azota (Ripa i sar., 2009; Wu i sar., 2008).

Uticaj različitih kombinacija izvora ugljenika i azota u podlozi za produkciju antagonističkih agenasa efikasnih na fitopatogene gljive *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) i *F. avenaceum* (KA12 i KA13) primenom *S. hygrosopicus* prikazano je u Tabelama 10-17.

Tabela 5.5. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *A. alternata* KA10

Izvor variranja	SS-suma kvadrata	Df-stepeni slobode	MS-sredina kvadrata	F-vrednost	p-vrednost
Kombinacija C+N	1635,66	29	56,40	64,26	0,00**
Greška	52,67	60	0,88		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Jednofaktorijalna analiza uticaja različitih kombinacija izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 (tabela 5.5.) pokazuje da variranje izvora ugljenika i azota statistički veoma značajno utiče na inhibiciju rasta micelije testiranog izolata ( $p < 0,01$ ). Kako bi se dobilo više informacija o razlikama u značajnosti uticaja pojedinih kombinacija izvora ugljenika i azotana produktivnost *S. hygrosopicus*, urađena je detaljnija post-hoc analiza primenom Duncan's multiple range testa.

Tabela 5.6. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10

Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)	Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)
M+EK	17,00±0,00 <sup>a</sup>	Gy+SB	29,00±0,00 <sup>hik</sup>
L+SB	22,00±0,00 <sup>b</sup>	F+Pep	29,33±0,58 <sup>hijkl</sup>
L+Pep	23,00±0,00 <sup>bc</sup>	L+NaNO <sub>3</sub>	30,00±0,00 <sup>ijklm</sup>
F+EK	23,00±0,00 <sup>b</sup>	M+NaNO <sub>3</sub>	30,67±1,15 <sup>jlmn</sup>
L+EK	23,00±1,00 <sup>b</sup>	F+bez N	30,67±2,08 <sup>ijklmn</sup>
F+SB	23,67±1,15 <sup>bc</sup>	S+EK	31,00±0,00 <sup>lmn</sup>
Gc+Pep	24,67±1,15 <sup>cd</sup>	L+bez N	31,00±1,00 <sup>lmn</sup>
Gc+NaNO <sub>3</sub>	25,67±2,08 <sup>de</sup>	S+bez N	31,67±1,15 <sup>mno</sup>
F+NaNO <sub>3</sub>	26,33±0,58 <sup>ef</sup>	S+Pep	32,00±0,00 <sup>nor</sup>
M+SB	26,67±2,08 <sup>ef</sup>	Gy+EK	32,00±1,00 <sup>no</sup>
Gy+NaNO <sub>3</sub>	27,00±1,00 <sup>efg</sup>	Gc+SB	33,00±1,00 <sup>opr</sup>
M+bez N	27,67±1,15 <sup>fgh</sup>	Gc+bez N	33,67±1,15 <sup>ps</sup>
Gy+Pep	28,33±0,58 <sup>ghi</sup>	S+SB	33,67±1,15 <sup>prs</sup>
M+Pep	28,67±1,15 <sup>hi</sup>	Gc+EK	34,67±1,15 <sup>st</sup>
S+NaNO <sub>3</sub>	29,00±0,00 <sup>hijk</sup>	Gy+bez N	35,67±1,15 <sup>t</sup>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Na osnovu rezultata dobijenih post-hoc analizom (tabela 5.6.) može se uočiti da se različite kombinacije izvora ugljenika i azota nalaze na različitim nivoima značajnosti. Dakle, nijedan izvor ugljenika ili azota nije se pokazao kao najbolji te se može zaključiti da na produktivnost *S. hygroscopicus* u cilju dobijanja željenih antagonističkih agenasa uticaj ima upravo njihova međusobna interakcija u podlozi za kultivaciju.

U skladu sa činjenicom da svi prečnici zone inhibicije iznad 22 mm ukazuje da je primenjeno sredstvo protiv fitopatogenih gljiva visoko efikasno, možemo zaključiti da su sve kombinacije izvora ugljenika i azota pokazale zadovoljavajuću antifungalnu aktivnost na test fitopatogeni izolat *A. alternata* KA10 izuzev kombinacije maltoze i ekstrakta kvasca (M+EK). Dankanovim testom utvrđeno je da se dve podloge sa različitom kombinacijom izvora ugljenika i azota nalaze na istom nivou značajnosti (označene malim slovom t) i daju najveće prečnike zona inhibicije rasta micelije test izolata *A. alternata* KA10. Kombinacija glukoze i ekstrakta kvasca (Gc+EK) i kombinacija glicerola bez dodatnog izvora azota (Gy+bez N) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* dale su najveće zone inhibicije rasta micelije testiranog izolata.

Tabela 5.7. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3

Izvor variranja	SS-suma kvadrata	Df-stepeni slobode	MS-sredina kvadrata	F-vrednost	p-vrednost
Kombinacija C+N	1904,49	29	65,67	103,7	0,00**
Greška	38,00	60	0,63		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Rezultati uticaja različitih kombinacija izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 obrađeni jednofaktorijalnom analizom varijanse pokazuju da variranje izvora ugljenika i azota statistički veoma značajno utiče na prečnik zone inhibicije testiranog izolata (tabela 5.7).

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 5.8., može se uočiti da najbolja inhibicija rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 nastaje kultivacijom *S. hygroscopicus* na podlogama sa nekoliko različitih kombinacija izvora ugljenika i azota (označene malim slovom k). Od svih spomenutih kombinacija, čak tri ne sadrže u svom sastavu dodatni izvor azota (bez N). U ovim podlogama kao izvor ugljenika korišćen su glicerol, laktoza i fruktoza (Yen i Li, 2014; Jonsbu i sar., 2002; Singh i sar., 2009). Izvor azota ima značajnu ulogu u eksponencijalnoj fazi rasta ćelija proizvodnog mikroorganizma međutim, poznato je da limitiranjem njegovog prisustva u podlozi za kultivaciju možemo uticati na raniji ulazak u stacionarnu fazu u kojoj dolazi do produkcije željenih aktivnih metabolita. Ovo odsustvo dodatnog izvora azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* može biti razlog dobijanja velikih prečnika zona inhibicije rasta micelije testiranog izolata.

Tabela 5.8. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3

Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)	Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)
S+NaNO <sub>3</sub>	22,00±0,00 <sup>a</sup>	Gy+SB	29,33±0,58 <sup>ef</sup>
F+NaNO <sub>3</sub>	22,67±1,15 <sup>ab</sup>	F+EK	29,67±1,15 <sup>fh</sup>
Gc+Pep	23,00±0,00 <sup>ab</sup>	Gy+Pep	31,00±0,00 <sup>g</sup>
M+EK	23,00±1,00 <sup>ab</sup>	L+Pep	31,00±1,00 <sup>gh</sup>
M+NaNO <sub>3</sub>	23,67±1,15 <sup>b</sup>	F+SB	31,67±1,15 <sup>gi</sup>
Gc+NaNO <sub>3</sub>	23,67±2,08 <sup>b</sup>	S+Pep	32,00±0,00 <sup>gi</sup>
L+SB	24,00±0,00 <sup>b</sup>	S+EK	33,00±0,00 <sup>i</sup>
M+SB	24,00±0,00 <sup>b</sup>	S+bez N	34,33±0,58 <sup>j</sup>
M+Pep	25,67±1,15 <sup>c</sup>	Gc+bez N	34,67±1,15 <sup>j</sup>
Gc+SB	26,67±1,15 <sup>cd</sup>	Gy+bez N	35,00±0,00 <sup>jk</sup>
M+bez N	27,00±1,00 <sup>cd</sup>	L+bez N	35,00±0,00 <sup>jk</sup>
Gc+EK	28,00±1,00 <sup>de</sup>	Gy+EK	35,00±0,00 <sup>jk</sup>
L+NaNO <sub>3</sub>	28,67±1,15 <sup>ef</sup>	S+SB	35,33±0,58 <sup>jk</sup>
F+Pep	28,67±2,08 <sup>ef</sup>	L+EK	35,67±2,08 <sup>jk</sup>
Gy+NaNO <sub>3</sub>	29,00±0,00 <sup>ef</sup>	F+bez N	36,33±0,58 <sup>k</sup>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Takođe, izvor azota može biti neophodan i kod sekundarnog metabolizma ukoliko je potreban za biosintezu aktivnog jedinjenja. Međutim, pretpostavljamo da kod produkcije antagonista skladišnih patogena jabuke, ovo nije slučaj. S druge strane, ekstrakt kvasca se u kombinaciji sa glicerolom i laktozom kao izvorima ugljenika takođe pokazao kao dobar izvor azota. Međutim, i kombinacija skroba i sojinog brašna u podlozi nalazi se na istom nivou



značajnosti sa prethodno navedenim kombinacijama formirajući velike prečnike zona inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3.

Tabela 5.9. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12

Izvor variranja	SS-suma kvadrata	Df-stepeni slobode	MS-sredina kvadrata	F-vrednost	p-vrednost
Kombinacija C+N	1857,83	29	64,06	169,6	0,00**
Greška	22,67	60	0,38		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja sastava podloge na inhibiciju rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 (tabela 5.9.) pokazuje da, i kod ovog test izolata variranje izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* veoma značajno utiče na njegov prečnik zone inhibicije rasta micelije.

Tabela 5.10. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12

Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)	Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)
L+SB	17,00±0,00 <sup>a</sup>	S+bez N	26,00±0,00 <sup>fg</sup>
S+Pep	17,00±0,00 <sup>a</sup>	Gy+SB	26,00±0,00 <sup>fg</sup>
M+NaNO <sub>3</sub>	17,00±0,00 <sup>a</sup>	F+SB	26,00±1,00 <sup>fg</sup>
M+SB	17,00±0,00 <sup>a</sup>	L+EK	26,00±1,00 <sup>fg</sup>
Gc+NaNO <sub>3</sub>	17,00±0,00 <sup>a</sup>	M+bez N	26,33±0,58 <sup>gh</sup>
M+EK	17,00±1,00 <sup>a</sup>	Gy+EK	26,67±1,15 <sup>gh</sup>
S+NaNO <sub>3</sub>	17,00±1,00 <sup>a</sup>	L+Pep	27,00±0,00 <sup>ghi</sup>
L+NaNO <sub>3</sub>	19,00±1,00 <sup>b</sup>	S+EK	27,00±1,00 <sup>ghi</sup>
Gc+Pep	20,67±1,15 <sup>c</sup>	F+EK	27,33±0,58 <sup>hi</sup>
F+NaNO <sub>3</sub>	21,67±2,08 <sup>c</sup>	Gc+EK	28,00±0,00 <sup>ij</sup>
M+Pep	23,00±0,00 <sup>d</sup>	Gc+bez N	28,00±0,00 <sup>ij</sup>
Gy+Pep	23,67±2,08 <sup>d</sup>	F+bez N	28,67±1,15 <sup>j</sup>
Gy+NaNO <sub>3</sub>	24,00±0,00 <sup>de</sup>	Gy+bez N	30,00±0,00 <sup>k</sup>
F+Pep	25,00±0,00 <sup>ef</sup>	L+bez N	30,00±0,00 <sup>k</sup>
S+SB	25,00±0,00 <sup>ef</sup>	Gc+SB	31,00±1,00 <sup>k</sup>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Prema Dankanovom testu (tabela 5.10.), čak deset kombinacija izvora ugljenika i azota u podlozi za produkciju antifungalnih agenasa ne pokazuju zadovoljavajuću inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 (označeni malim slovima a, b i c). Međutim, tri kombinacije izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* pokazuju najbolji efekat na inhibiciju rasta micelije ispitivanog test izolata. Ove tri kombinacije nalaze se na najvišem nivou značajnosti a među njima čak dve kombinacije ne sadrže dodatni izvor azota (bez N) i u njima su kao izvori ugljenika korišćeni glicerol i laktoza.

Tabela 5.11. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13

Izvor variranja	SS-suma kvadrata	Df-stepeni slobode	MS-sredina kvadrata	F-vrednost	$p$ -vrednost
Kombinacija C+N	1908,49	29	65,81	370,2	0,00**
Greška	10,67	60	0,18		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Statističkom analizom varijanse uticaja kombinacije izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13 potvrđuju se rezultati dobijeni na prethodno analiziranim izolatima (tabela 5.11). Dakle, sastav podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus* statistički veoma značajno utiče na prečnik zone inhibicije micelije ispitivanog izolata *F. avenaceum* KA13.

Tabela 5.12. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13

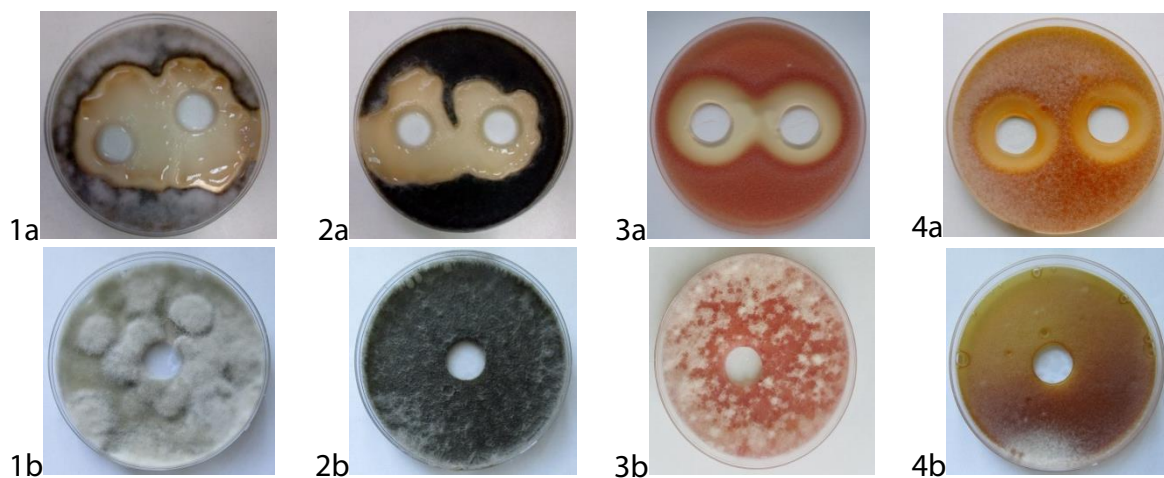
Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)	Kombinacija izvora C i N	Prečnik zone inhibicije (mm)
L+SB	17,00±0,00 <sup>a</sup>	S+SB	25,00±0,00 <sup>cde</sup>
L+NaNO <sub>3</sub>	17,00±0,00 <sup>a</sup>	F+Pep	25,33±0,58 <sup>def</sup>
Gc+Pep	17,00±0,00 <sup>a</sup>	Gy+NaNO <sub>3</sub>	25,33±0,58 <sup>def</sup>
S+NaNO <sub>3</sub>	17,00±0,00 <sup>a</sup>	S+EK	25,67±1,15 <sup>efg</sup>
Gc+NaNO <sub>3</sub>	17,00±0,00 <sup>a</sup>	Gy+SB	25,67±2,08 <sup>efg</sup>
M+NaNO <sub>3</sub>	17,00±0,00 <sup>a</sup>	Gy+EK	26,00±1,00 <sup>fg</sup>
M+SB	17,00±0,00 <sup>a</sup>	Gc+EK	26,33±0,58 <sup>gh</sup>
M+EK	17,00±1,00 <sup>a</sup>	L+Pep	27,00±0,00 <sup>h</sup>
F+NaNO <sub>3</sub>	17,00±1,00 <sup>a</sup>	F+bez N	27,00±0,00 <sup>h</sup>
S+Pep	17,00±1,00 <sup>a</sup>	Gc+bez N	27,00±1,00 <sup>h</sup>
M+Pep	22,67±2,08 <sup>b</sup>	M+bez N	27,00±1,00 <sup>h</sup>
F+SB	24,33±0,58 <sup>c</sup>	Gy+bez N	29,00±0,00 <sup>i</sup>
L+EK	24,67±1,15 <sup>cd</sup>	F+EK	29,00±0,00 <sup>i</sup>
S+bez N	24,67±1,15 <sup>cd</sup>	L+bez N	29,00±0,00 <sup>i</sup>
Gy+Pep	25,00±0,00 <sup>cde</sup>	Gc+SB	29,67±1,15 <sup>i</sup>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Rezultati Dankanovog testa kod primenjenog test izolata *F. avenaceum* KA13 pokazuju da deset kombinacija ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* nije efikasno u kontroli ove fitopatogene gljive (u tabeli 5.12. označene malim slovom a). Međutim, kod ovog izolata kao i kod prethodno analiziranih, najbolje prečnike zona inhibicije dale su četiri kombinacije izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*. Na najvišem nivou značajnosti nalaze se podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus* u kojima su kao izvor ugljenika i azota kombinovani glicerol i laktoza bez dodatog izvora azota (Gy+bez N; L+bez N) (Gesheva sar., 2005; Jonsbu i sar, 2002) i podloge sa fruktozom i ekstraktom kvasca (F+EK) i glukozom i sojinim brašnom (Gc+SB) (u tabeli 5.12. označene malim slovom i).

Analizom prethodno dobijenih rezultata može se zaključiti da dve kombinacije izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus* pokazuju veoma dobru inhibiciju rasta micelije izolata vrste *F. avenaceum* dok se jedna kombinacija našla na najvišem nivou značajnosti za izolate vrste *A. alternata*. Naime, podloge koje nisu sadržale dodatni izvor azota (bez N) a sadržale su kao izvor ugljenika glicerol i laktozu, pokazale su najveće prečnike zona inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* (KA12 i KA13), dok se kod izolata *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) najbolje pokazala podloga sa kombinacijom glicerola i bez dodatnog izvora azota (Gy+bez N). S obzirom da se kod svih pomenutih kombinacija nije dodavao izvor azota, ovi rezultati ukazuju na mogućnost formulacije jednostavnije hranjive podloge koja ne sadrži dodatni izvor azota što ujedno pojednostavnjuje pripremu i utiče na cenu podloge a samim tim značajno utiče i na ekonomičnost bioprocasa (Ortiz i sar., 2007).

Svakako da dobijene informacija o sastavu osnovnih nutrijenata podloge za kultivaciju možemo iskoristiti za pronalaženje adekvatne zamene u vidu otpadnih tokova drugih industrija. Činjenica da otpadni glicerol koji nastaje kao nus-proizvod nakon proizvodnje biodizela predstavlja izuzetan izvor ugljenika sa velikom mogućnošću primene u različitim biotehnološkim procesima, njegova primena u industrijskoj mikrobiologiji i proizvodnji visokovrednih proizvoda kao što su biofungicidi itekako je opravdana (Reungsang i sar., 2013). Dakle, potencijalna upotreba sirovog glicerola u biotehnološkim procesima značajno bi uticala na cenu proizvodnje.



Slika 5.7. Inhibicija rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 (1), *A. alternata* T1Jg3 (2), *F. avenaceum* KA12 (3) i *F. avenaceum* KA13 supernatantom kultivacione tečnosti *S. hygrosopicus* na podlozi koja je sadržala Gy+bez N

Na slici 5.7. prikazane su zone inhibicije rasta micelije sva četiri izolata nastala delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti *S. hygrosopicus* na podlozi koja je sadržala glicerol kao izvor ugljenika i pored već prisutnog neorganskog azota, nije sadržala dodatni izvor azota (Gy+bez N).

Na osnovu prikazanih rezultata, u nastavku istraživanja korišćen je glicerol kao izvor ugljenika i, pored već prisutnog neorganskog azota u osnovnoj podlozi, dodatni izvor azota nije korišćen.

## 5.8. ISPITIVANJE UTICAJA RAZLIČITIH KOLIČINA UGLJENIKA, AZOTA I FOSFORA U PODLOZI ZA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Metabolička aktivnost proizvodnog mikroorganizma u velikoj meri zavisi od sastava hranljive podloge. Sa ciljem razumevanja uticaja različitih količina odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora na proizvodnju antagonista skladišnih patogena jabuke primenom proizvodnog mikroorganizma *S. hygrosopicus*, u okviru ove faze istraživanja ispitan je uticaj tri faktora na uspešnost proizvodnog procesa. Na osnovu prethodno dobijenih rezultata (poglavlje 5.7.), podacima iz naučne literature (Chen i sar, 2011) i u skladu sa primenjenim eksperimentalnim planom, u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus* varirani su sadržaj ugljenika (glicerol), azota ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i fosfora (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Nakon odabira faktora koji će biti vrirani u okviru ove faze istraživanja, definisani su adekvatni odzivi i izvršeno je matematičko modelovanje.

Već je rečeno da su izvor ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju esencijalni za svaki mikroorganizam jer pre svega omogućavaju njihov rast i umnožavanje. Međutim, pored ova dva nutrijenta, fosfor se u naučnoj i stručnoj literature spominje kao važan nutrijent u svim biotehnoškim procesima jer ima značajnu ulogu u ćelijskom metabolizmu. Fosfor se u ćelijama mikroorganizama nalazi u obliku fosfata i to najčešće u nukleotidima i nukleinskim kiselinama. Smatra se da je njegovo prisustvo u podlozi veoma značajno i sa aspekta kontrole biosinteze velikog broja sekundarnih metabolita (Martin, 2004; Ali i sar., 2014) jer limitiranjem njegovog prisustva u podlozi za kultivaciju može se uticati na raniji ulazak mikroorganizma u stacionarnu fazu rasta. Sa druge strane, brojni sekundarni metaboliti u svojoj strukturi sadrže fosfor te je u tom slučaju njegovo prisustvo u podlozi značajno i u stacionarnoj fazi rasta.

U okviru ove faze istraživanja kao izvor fosfora korišćen je K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Prethodnim naučnim istraživanjima utvrđeno je da od svih ispitanih mineralnih materija upravo prisustvo soli K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ima najveći uticaj na produkciju antimikrobnih metabolita primenom roda *Streptomyces* (Ripa i sar., 2009). Zbog osobine dobre rastvorljivosti, niske cene i relativno lakog asimilovanja od strane proizvodnog mikroorganizma, u bioprocima se kao izvori fosfora u podlogama za kultivaciju uglavnom koriste neorganski fosfati.

Kada se ispituje uticaj tri faktora na posmatran proces, najčešće se zbog svoje efikasnosti primenjuje Boks-Benkenov dizajn. Ovaj plan ima prednost nad ostalim u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti (Jokić, 2010). U okviru ovih

istraživanja korišćen je plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački što podrazumeva izvođenje 15 kultivacija pod tačno definisanim procesnim uslovima u trajanju od 7 dana. Opsezi odnosno nivoi variranja svakog od ispitivanih faktora odabrani su na osnovu rezultata prethodnih istraživanja, podataka iz naučno dostupne literature i prilagođeni su eksperimentu (Mitrović i sar., 2017; Yen i Li, 2014; Jing, 2010; Chen i sar., 2011).

Rezultati 15 nezavisnih eksperimenata baziranih na Box-Behnken-ovom dizajnu prikazani su tabelarno. Vrednosti nezavisnih promenljivih varirani su na tri nivoa: glicerol (5; 12,5 i 20 g/l),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,25; 0,5 i 0,75 g/l) i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1; 2 i 3 g/l). Njihovi odzivi, odnosno vrednosti zavisnih promenljivih (Y1-rezidualni glicerol, Y2-rezidualni azot i Y3-rezidualni fosfati kao i vrednosti prečnika zona inhibicije za Y4-*A. alternata* KA10, Y5-*A. alternata* T1Jg3, Y6-*F. avenaceum* KA12 i Y7-*F. avenaceum* KA13), prikazani su u tabeli 5.13. Sve vrednosti zavisnih promenljivih ispitani su po završetku bioprocasa. Ispitivanjem rezidualnih vrednosti glicerola,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dobijaju se podaci o njihovom iskorišćenju tokom bioprocasa. Ovi podaci su veoma bitni jer daju informacije o količini neiskorišćenih nutrijenata i mogućnosti smanjenja njihovih inicijalnih vrednosti u podlozi za kultivaciju što utiče na cenu bioprocasa ali je značajno i sa aspekta smanjenja opterećenja otpadnih efluenata. Sa druge strane, podaci o prečnicima zona inhibicije rasta micelije sva četiri ispitana izolata daju informacije o količini produkovanih antagonističkih agenasa i njihovoj efikasnosti na ispitivane skladišne patogene vrste *A. alternata* i *F. avenaceum*.

Tabela 5.13. Vrednosti rezidualnog ugljenika, rezidualnog azota, rezidualnog fosfata i prečnika zone inhibicije sva četiri test izolata u skladu sa Box-Behnkenovim eksperimentalnim planom

Redni broj	Rezidualni glicerol (g/l)	Rezidualni azot (g/l)	Rezidualni fosfati (g/l)	Prečnik zone inhibicije (mm)			
				<i>A.alternata</i>		<i>F.avenaceum</i>	
				KA10	T1Jg3	KA12	KA13
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7
1	1,56	0,154	1,092	30	31	21	23
2	7,30	0,160	1,043	29	35	25	26
3	2,29	0,180	0,601	30	33	23	25
4	6,82	0,157	1,792	21	25	19	18
5	1,90	0,150	0,312	27	30	17	21
6	2,05	0,193	0,865	22	32	22	22
7	0,73	0,174	1,503	27	28	22	22
8	6,92	0,134	1,613	22	25	17	17
9	1,15	0,193	0,573	22	30	17	19
10	1,49	0,160	0,439	23	29	17	17
11	1,27	0,137	1,556	22	27	17	17
12	1,62	0,185	1,287	19	23	17	17
13	1,18	0,168	0,848	17	23	17	17
14	1,11	0,168	0,748	17	24	17	17
15	0,94	0,165	0,641	17	24	17	17

Kako bi se definisale matematičke jednačine koje opisuju uticaj variranih parametara na odabrane pokazatelje uspešnosti bioprocesa, podaci iz tabele 5.13. fitovani su polinomom drugog reda. Prednost ovog modela je što uključuje i članove koji opisuju interakciju između različitih faktora. Koeficijentom determinacije procenjuje se uspešnost fitovanja. Za procenu statističke značajnosti svakog od koeficijenata regresione jednačine korišćena je p-vrednost. Regresioni koeficijenti su značajni ukoliko je njihova p-vrednost manja od 0,05 (interval poverenja 95%).

Na osnovu predznaka koeficijenata u razvijenim regresionim jednačinama, može se ustanoviti smer uticaja svakog faktora ili interakcije odabranih faktora na posmatrane odzive. Ukoliko je predznak linearnog ili kvadratnog člana pozitivan, veza je direktna dok se kod prisustva negativnog predznaka smatra se da je veza inverzna. S druge strane, pozitivan predznak kod koeficijenta koji opisuje interakciju ukazuje na sinergistički efekat dok negativan govori o antagonističkom efektu među analiziranim faktorima (Bradley, 2007). Svakako, za bolje razumevanje interakcije variranih faktora na produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke, regresione jednačine predstavljaju se grafički kao trodimenzionalne odzivne površine. Svaka odzivna površina prikazuje modelom predviđen uticaj dva faktora na posmatran odziv pri čemu treći faktor ima konstantnu vrednost.

Tabela 5.14. Analiza varijanse modelovanih odziva

Odziv	Rezidual		Model				F-vrednost	p-vrednost
	SS	Df	MS	SS	Df	MS		
Y1	3,4731	5	0,69462	171,5268	10	17,15268	24,69368	0,00123
Y2	0,00006	5	0,00001	0,414293	10	0,041429	3438,12	<0,0000001
Y3	0,10613	5	0,02123	17,7425	10	1,77425	83,58559	0,000063
Y4	2,92	5	0,583	11910,08	10	1191,008	2041,729	<0,0000001
Y5	6,5	5	1,3	8226,5	10	822,65	632,8077	<0,0000001
Y6	2,5	5	0,5	5944,5	10	594,45	1188,9	<0,0000001
Y7	2,0	5	0,4	5523,0	10	552,3	1380,75	<0,0000001

Takođe, provera adekvatnosti i značajnosti matematičkih modela izvršena je primenom statističke tehnike za obradu eksperimentalnih rezultata, analize varijanse. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.14. Rezultati pokazuju da su modeli polinoma drugog reda svih modelovanih odziva statistički značajni/veoma značajni, što potvrđuju veoma niske p-vrednosti.

### 5.8.1. MATEMATIČKI MODELI ZA VREDNOSTI REZIDUALNOG SADRŽAJA GLICEROLA, AZOTA I FOSFATA

Eksperimentalni podaci koji se odnose na vrednosti rezidualnog sadržaja glicerola, azota i fosfata nakon završetka kultivacije fitovani su polinomom drugog reda i dobijene su regresione jednačine koje opisuju uticaj variranih procesnih parametara na pomenute

odzive. Regresioni koeficijenti, njihova značajnost i koeficijenti determinacije prikazani su u tabeli 5.15.

Visoke vrednosti (veće od 0,900) koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) ukazuju na veoma dobro fitovanje eksperimentalnih rezultata rezidualnog glicerola, rezidualnog azota i rezidualnog fosfata polinomom drugog reda. Za fitovanje vrednosti rezidualnog sadržaja glicerola ostvaren je koeficijent determinacije koji iznosi 0,955. Ovo pokazuje da je model adekvatan jer je njime objašnjeno 95,5% ukupnih varijacija posmatranog odziva (tabela 5.13). Posmatrajući značajnost koeficijenata regresione jednačine za posmatrani odziv uočava se da na količinu neiskorišćenog glicerola utiču linearni i kvadratni član sadržaja glicerola u podlozi kao i interakcija sadržaja glicerola i fosfata. Ovo se moglo očekivati obzirom da fosfati kontrolišu mnoge metaboličke procese u ćelijama mikroorganizama i značajno utiču na produkciju različitih visokovrednih proizvoda (Martin, 2004). S druge strane, glicerol je veoma važan ćelijama mikroorganizama pre svega za rast ali i za produkciju velikog broja metabolita (Ripa i sar., 2009). U Prilogu 1, Slika 8.1. prikazane su odzivne površine koje ilustruju uticaj dva faktora na sadržaj rezidualnog glicerola pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora. Odzivne površine pokazuju da se maksimalna vrednost posmatranog odziva javlja primenom najveće količine glicerola iz ispitivanog opsega (20 g/l). Pri malim vrednostima izvora azota iz ispitivanog opsega i porastom početnog sadržaja glicerola raste vrednost rezidualnog sadržaja glicerola u podlozi međutim, primenom većeg početnog sadržaja azota i primenom početnog sadržaja glicerola u opsegu od 5-10 g/l, vrednost rezidualnog sadržaja glicerola pokazuje najmanje vrednosti verovatno kao posledica dužeg trajanja ekspanzionalne faze rasta koja je omogućena prisustvom većeg sadržaja azota u podlozi.

Tabela 5.15. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za sadržaj rezidualnog glicerola, azota i fosfata

Odziv	Y1 – Rezidualni glicerol		Y2 – Rezidual azot		Y3 – Rezidualni fosfati	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
<i>Odsečak</i>						
$b_0$	8,5039	0,071361	0,157271*	0,000160*	1,55207*	0,062968*
<i>Linearni</i>						
$b_1$	-1,1415*	0,006207*	0,009483*	0,000276*	-0,133115*	0,029275*
$b_2$	-12,7200	0,184609	-0,109000*	0,024962*	-4,082317*	0,036933*
$b_3$	0,5454	0,802440	-0,017458	0,098417	0,404734	0,313633
<i>Kvadratni</i>						
$b_{11}$	0,0439*	0,002343*	-0,000090*	0,037889*	0,004404*	0,022264*
$b_{22}$	15,1867	0,080263	0,015000	0,625938	2,2171816	0,12715460
$b_{33}$	-0,6433	0,198121	0,000937	0,625937	0,0797419	0,34108378
<i>Interakcija</i>						
$b_{12}$	-0,1613	0,500437	0,009483*	0,000276*	0,165201*	0,008075*
$b_{13}$	0,2013*	0,015163*	-0,002783*	0,000070*	-0,014743	0,189491
$b_{23}$	0,0100	0,995450	0,080500*	0,000084*	-0,136093	0,6601085
$R^2$	<b>0,955</b>		<b>0,987</b>		<b>0,965</b>	

\*Statistički značajan uticaj ( $p < 0,05$ )

U slučaju modela za rezidualni azot statistički značajni članovi jednačine su linearni član sadržaja glicerola i azota kao i kvadratni član sadržaja glicerola.  $p$ -vrednosti pokazuju da su u modelu za rezidualni azot statistički značajne sve tri interakcije. Od svih interakcija, jedino interakcija između sadržaja glicerola i azota zbog negativnog predznaka ukazuje na antagonistički efekat. Za fitovanje vrednosti rezidualnog sadržaja azota ostvaren je koeficijent determinacije od 0,987 što ukazuje da se definisanim matematičkim modelom nije moglo objasniti svega 1,3% od ukupnih varijacija u vrednostima posmatranog odziva. Odzivne površine koje prikazuju uticaj dva faktora na sadržaj rezidualnog azota pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora prikazane su u Prilogu 1. Posmatrajući uticaj inicijalnog sadržaja glicerola i azota na sadržaj rezidualnog azota (slika 8.2.(a)) uočava se da pri velikim vrednostima početnog sadržaja glicerola nema značajne razlike u sadržaju rezidualnog azota bez obzira na početni sadržaj azota u podlozi, dok se pri malim vrednostima početnog sadržaja glicerola i porastom početnog sadržaja izvora azota njegova rezidualna količina povećava, verovatno kao posledica limitiranog umnožavanja biomase prisutnom količinom glicerola u podlozi. Slika 8.2. (b) ilustruje uticaj interakcije glicerola i  $K_2HPO_4$  na sadržaj rezidualnog azota pri konstantnoj vrednosti  $(NH_4)_2SO_4$  od 0,5 g/l. Prikazana odzivna površina pokazuje da se najveće vrednosti posmatranog odziva javljaju upotrebom 20 g/l glicerola i 1 g/l izvora fosfata u podlozi. U slučaju uticaja interakcije  $K_2HPO_4$  i  $(NH_4)_2SO_4$  pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola (slika 8.2.(c)), može se primetiti da se pri srednjim vrednostima početnog sadržaja azota u podlozi, najveća količina rezidualnog azota postiže primenom najmanjih vrednosti sadržaja fosfata iz ispitivanog opsega, verovatno kao posledica limitiranja umnožavanja proizvodnog mikroorganizma uslovljeno malim sadržajem fosfata u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* (Martin, 2004).

Statistički značajni članovi jednačine u modelu za rezidualne fosfate su linearni i kvadratni član sadržaja glicerola, linearni član sadržaja azota i interakcija između sadržaja glicerola i sadržaja azota. Vrednost koeficijenta determinacije u ovom modelu je 0,965 što znači da je 96,5% ukupnih varijacija posmatranog odziva objašnjeno modelom. Uticaj dva faktora na sadržaj rezidualnog fosfata pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora prikazan je na odzivnim površinama iz Priloga 1. Slika 8.3. (a) ilustruje modelom predviđen uticaj sadržaja glicerola i  $(NH_4)_2SO_4$  u podlozi na sadržaj rezidualnog fosfata pri konstantnoj vrednosti  $K_2HPO_4$  koji u regresionoj jednačini pokazuje statističku značajnost. Analizom odzivne površine zaključuje se da maksimalne vrednosti zaostalog fosfata nastaju kada je sadržaj glicerola u podlozi 20 g/l a sadržaj  $(NH_4)_2SO_4$  0,75 g/l. Takođe, posmatrajući odzivne površine može se zaključiti da primena manjih količina izvora fosfata u podlozi rezultuje postizanju manjih vrednosti posmatranog odziva (slika 8.3. (b) i 8.3. (c)).



## 5.8.2. MATEMATIČKI MODELI ZA PREČNIKE ZONA INHIBICIJE NA ISPITIVANE IZOLATE SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Uticaj izvora ugljenika, azota i fosfora na prinos aktivnih komponenti efikasni na skladišne patogene jabuka vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*, posmatrani su merenjem prečnika zona inhibicije rasta micelije ispitivanih test izolata. Rezultati određivanja prečnika zone inhibicije za sva četiri test izolata nastalih delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus*, fitovani su polinomom drugog reda kako bi se definisali matematički modeli koji opisuju uticaj variranih faktora na posmatrani odziv.

Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijenti determinacije prikazani su u tabeli 5.16. S obzirom da su dobijeni koeficijenti determinacije za četiri test izolata veći od 0,900 može se zaključiti da su eksperimentalni rezultati veoma dobro fitovani polinomom drugog reda.

Tabela 5.16. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za prečnike zona inhibicije na testirane izolate

Odziv	Y4 – Prečnik zone inhibicije KA10 ( <i>A. alternata</i> )		Y5 – Prečnik zone inhibicije T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )		Y6 – Prečnik zone inhibicije KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )		Y7 – Prečnik zone inhibicije KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
<i>Odsečak</i>								
$b_0$	50,75143*	0,000175*	41,89352*	0,000064*	13,41713*	0,004661*	25,33333*	0,000489*
<i>Linearni</i>								
$b_1$	-2,800064*	0,000457*	-0,912962*	0,010780*	-0,46669	0,058568	-1,0667*	0,004129*
$b_2$	-43,67042*	0,011876*	-27,16666*	0,015792*	-8,66769	0,216238	-15,3333	0,080550
$b_3$	-1,5001285	0,6186998	-1,3333333	0,512766	9,16657*	0,001893*	4,7500*	0,042370*
<i>Kvadratni</i>								
$b_{11}$	0,120002*	0,000092*	0,078518*	0,000103*	0,06667*	0,000091*	0,0800*	0,000065*
$b_{22}$	60,00319*	0,001461*	46,66666*	0,000737*	20,00100*	0,012655*	24,0000*	0,009576*
$b_{33}$	0,7500054	0,261958	0,6666666	0,1543364	-1,24999*	0,012658*	-1,0000*	0,041901*
<i>Interakcija</i>								
$b_{12}$	-1,066653*	0,017134*	-1,60000*	0,000537*	-1,06667*	0,001460*	-1,3333*	0,000875*
$b_{13}$	0,0000057	0,9999428	-0,166666*	0,022212*	-0,33333*	0,000522*	-0,2000*	0,008149*
$b_{23}$	-3,999966	0,1397820	-2,999999	0,106745	0,00001	0,999996	2,0000	0,216437
$R^2$	0,978		0,986		0,982		0,983	

Posmatrajući regresionu jednačinu za prečnik zone inhibicije test izolata *A. alternata* KA10 može se uočiti da su statistički značajni linearni i kvadratni članovi sadržaja glicerola i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*. Deo regresione jednačine koji objašnjava interakciju između nutrijenata podloge pokazuje da je za prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 statistički značajan član interakcije glicerola i izvora azota u podlozi dok negativan predznak ukazuje na antagonistički efekat. Koeficijent determinacije pokazuje da je 97,8% ukupnih varijacija posmatranog odziva objašnjeno modelom (tabela 5.16).

Slika 5.8. (a) prikazuje modelom predviđen uticaj sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na inhibiciju rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2 g/l). Rezultati pokazuju da vrednost posmatranog odziva ima najveću vrednost kada se primeni najmanja količina glicerola iz ispitivanog opsega što je posledica limitiranja eksponencijalne faze rasta malim količinama izvora ugljenika. Ovo omogućava brži ulazak proizvodnog mikroorganizma u stacionarnu fazu rasta u kojoj nastaju željene aktivne komponente. S druge strane, pri konstantnoj vrednosti glicerola u podlozi sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na produkciju antagonističkih agenasa primenom *S. hygrosopicus* nema značajan uticaj.

Na slici 5.8. (b) prikazan je modelom predviđen uticaj sadržaja glicerola i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g/l). Analizom ove odzivne površine može se uočiti da primena minimalne vrednosti sadržaja glicerola iz ispitivanog opsega u podlozi utiče na povećanje prečnika zone inhibicije rasta micelije testiranog fitopatogenog izolata. S druge strane, pri konstantnoj vrednosti primenjenog glicerola u podlozi sadržaj fosfata ne pokazuje značajan uticaj na prečnik zone inhibicije ispitivanog izolata. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su i minimalne količine izvora fosfata iz ispitivanog opsega dovoljan za primarni metabolizam i umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma tokom stacionarne faze rasta. Takođe, može se pretpostaviti da ovaj nutrijent ne ulazi u sastav željenih antagonističkih agenasa.

Modelom predviđen uticaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola (12,5 g/l) prikazan je na slici 5.8. (c). Grafički predstavljeni rezultati potvrđuju da količina fosfata u podlozi nema značajan uticaj na prečnik zone inhibicije rasta micelije testirane gljive. S druge strane, smanjenjem sadržaja azota u podlozi utičemo na povećanje produkcije željenih antagonističkih agenasa efikasnih protiv testirane fitopatogene gljive *A. alternata* KA10 verovatno limitiranjem umnožavanja proizvodnog mikroorganizma ovim nutrijentom pri srednjim vrednostima izvora glicerola.

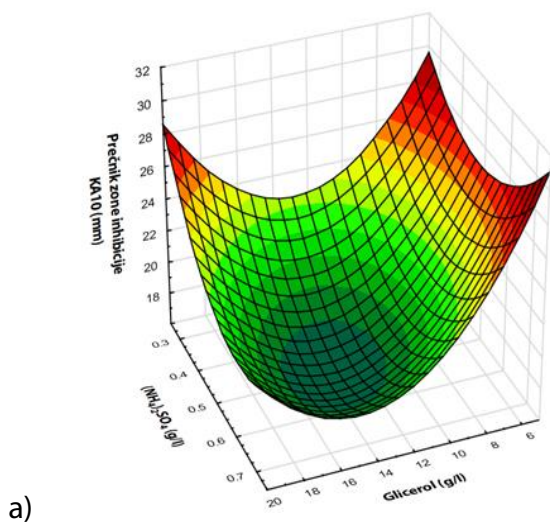
Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.16. koji se odnosi na regresionu jednačinu za prečnik zona inhibicije test izolata *A. alternata* T1Jg3, može se uočiti da su linearni i kvadratni članovi sadržaja glicerola i izvora azota koeficijenti koji pokazuju statističku značajnost s tim da za razliku od kvadratnih članova, linearni članovi pokazuju negativan uticaj na posmatrani odziv. Međutim, interakcija sadržaja glicerola i azota u podlozi kao i interakcije glicerola i fosfata su koeficijenti koji su statistički značajni u regresionoj jednačini za prečnik zone inhibicije izolata *A. alternata* T1Jg3 ali zbog negativnog predznaka ove interakcije ukazuju na antagonistički efekat. Interakcija izvora azota i fosfata u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus* ne pokazuje statističku značajnost u interval poverenja 95%. Koeficijent determinacije pokazuje da su rezultati prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 veoma dobro fitovani polinomom drugog reda pri čemu je dobijena vrednost 0,986.

Poređenjem rezultata dobijenih za oba *Alternaria* izolata može se zaključiti da za produkciju željenih antagonističkih agenasa primenom *S. hygroscopicus* a u cilju suzbijanja skladišnih patogena jabuke ovog roda, najvažniju ulogu imaju izvori ugljenika i azota. Ova dva nutrijenta značajno utiču na rast i umnožavanje ćelija mikroorganizama, ali očigledno da imaju i veoma važnu ulogu u produkciji željenih antagonističkih agenasa (Chen i sar., 2011). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da isti agens produkovan kultivacijom *S. hygroscopicus* pokazuje delovanje na oba testirana izolata, što je za očekivati s obzirom da se radi o izolatima iste vrste.

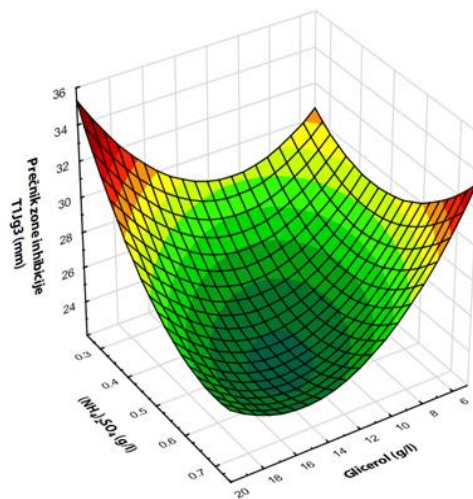
Na slici 5.9. (a) prikazan je modelom predviđen uticaj sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti sadržaja fosfata u podlozi (2 g/l). Odzivna površina pokazuje da se najmanja zona inhibicija rasta micelije testirane fitopatogene gljive javlja kada su u podlozi prisutne srednje vrednosti glicerola (12,5 g/l) i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g/l). Međutim, smanjenje jednog i istovremeno povećanje drugog nutrijenta u podlozi rezultira povećanju prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 što je potvrda antagonističkog efekta ova dva nutrijenta.

Modelom predviđen uticaj sadržaja glicerola i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 0,5 g/l, prikazan je na slici 5.9. (b). Grafički prikazani rezultati pokazuju da na posmatrani odziv značajno utiče sadržaj fosfata u podlozi ukoliko se primeni najveća količina glicerola iz ispitivanog opsega (20 g/l) pri sadržaju izvora azota od 0,5 g/l. Međutim, ukoliko je sadržaj glicerola u podlozi najmanji iz ispitivanog opsega, 5 g/l, posmatrajući odzivnu površinu može se zaključiti da sadržaj fosfata u podlozi nema značajan uticaj.

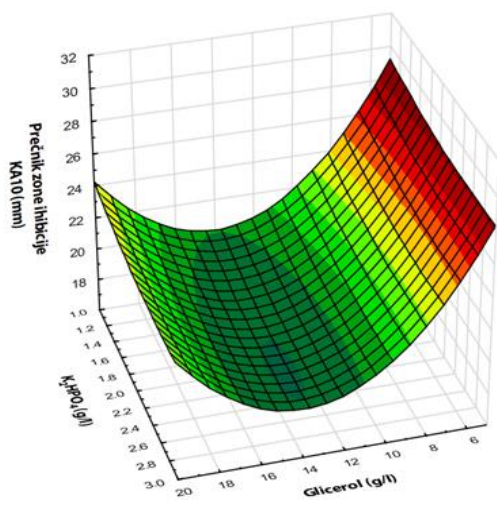
Slika 5.9. (c) ilustruje uticaj sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola (12,5 g/l). Grafički prikazani rezultati pokazuju da se maksimalna vrednost posmatranog odziva postiže kada je u podlozi prisutna najmanja količina  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i najmanja količina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  iz ispitivanog opsega. Primenom najmanjih količina oba nutrijenta i pri srednjoj vrednosti glicerola, može se pretpostaviti da je dobijanje velikog prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 posledica skraćenja eksponencijalne faze i bržeg ulaska proizvodnog mikroorganizma u stacionarnu fazu rasta u kojoj dolazi do produkcije željenih antagonističkih agenasa (Martin, 2004).



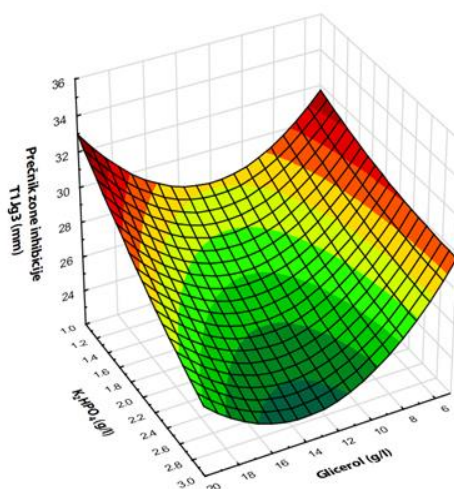
a)



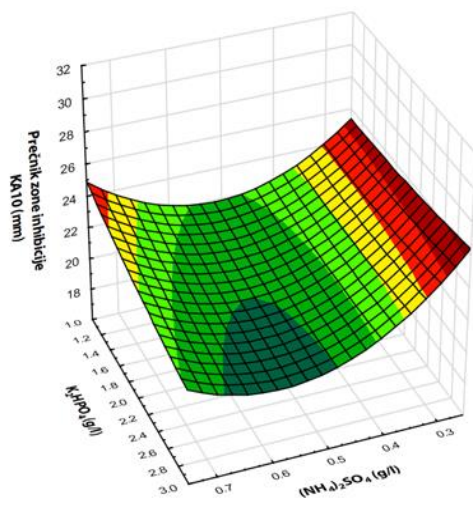
a)



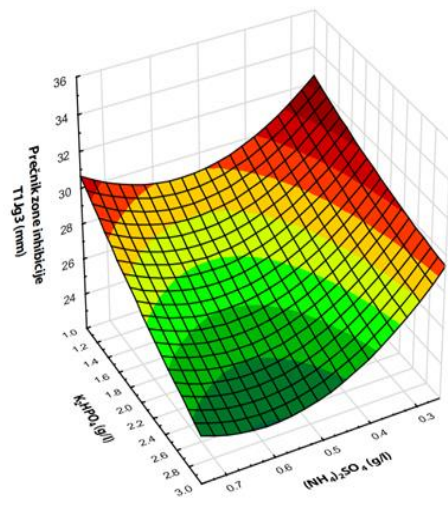
b)



b)



c)



c)

Slika 5.8. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

- a)  $K_2HPO_4$ ;
- b)  $(NH_4)_2SO_4$ ;
- c) glicerol

Slika 5.9. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

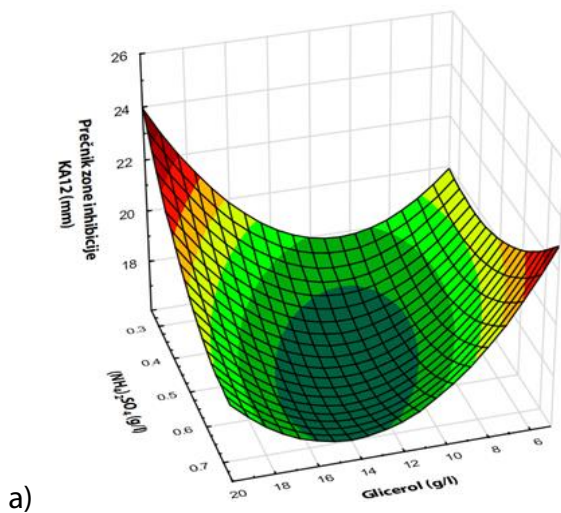
- a)  $K_2HPO_4$ ;
- b)  $(NH_4)_2SO_4$ ;
- c) glicerol

Rezultati prikazani u tabeli 5.16. koji se odnosi na regresionu jednačinu za prečnik zona inhibicije rasta micelije test izolata *F. avenaceum* KA12, pokazuju da veliki broj članova jednačine značajno utiče na produkciju antagonističkih agenasa efikasnih protiv testirane fitopatogene gljive. Od linearnih članova jedino inicijalni sadržaj fosfata ima statistički značajan uticaj na posmatran odziv, dok kod kvadratnih članova statističku značajnost pokazuju sadržaji sva tri nutrijenta u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*. Od članova jednačine koji opisuju značajnost interakcija pojedinih nutrijenata na posmatrani odziv, statistički značajni su interakcije glicerola sa izvorom azota i izvorom fosfata. Kod obe interakcije negativni predznak ukazuje na antagonistički efekat. Koeficijent determinacije pokazuje da su rezultati eksperimenta veoma dobro fitovani polinomom drugog reda i da je 98,2% ukupnih varijacija posmatranog odziva objašnjeno modelom.

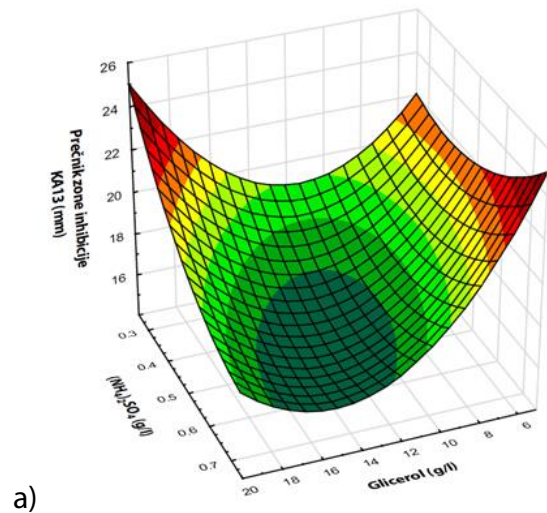
Slika 5.10. (a) prikazan je modelom predviđen uticaj sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj vrednosti sadržaja fosfata u podlozi (2 g/l). Rezultati prikazani na odzivnoj površini pokazuju da vrednost posmatranog odziva raste sa porastom sadržaja glicerola u podlozi i da maksimalnu vrednost dostiže kada je sadržaj glicerola najveći iz ispitivanog opsega, 20 g/l, ukoliko je istovremeno sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  najmanji iz ispitivanog opsega, 0,25 g/l. Dakle, primena najmanjih količina glicerola i najvećih količina azota iz ispitivanog opsega, i obrnuto, znači da se jednim od ta dva nutrijenta limitira rast proizvodnog mikroorganizma.

Kao što je slučaj kod prethodnog uticaja, i uticaj interakcije sadržaja glicerola i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj vrednosti  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (slika 5.10. (b)) takođe predstavlja statistički značajan član regresione jednačine za prečnik zona inhibicije ispitivanog test izolata (tabela 5.16). Posmatrajući odzivnu površinu može se zaključiti da prečnik zone inhibicije rasta micelije testirane fitopatogene gljive raste sa porastom sadržaja glicerola u podlozi ukoliko je sadržaj  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/l. Međutim, vrednost posmatranog odziva pokazuje željenu vrednosti i u slučaju kada je u podlozi prisutna najmanja koncentracija glicerola iz ispitivanog opsega (5 g/l) i najveća koncentracija  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  iz ispitivanog opsega (3 g/l).

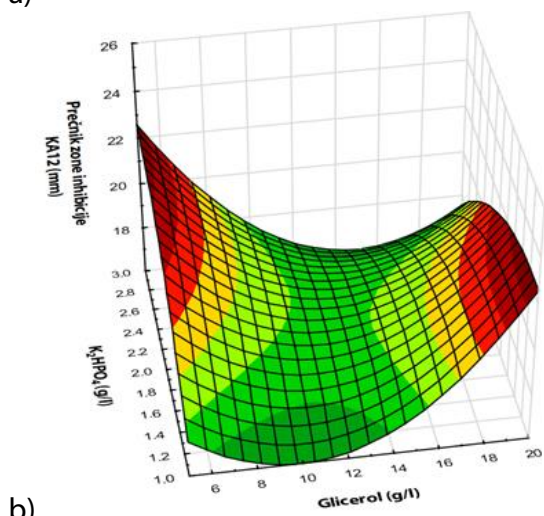
Na slici 5.10. (c) prikazan je modelom predviđen uticaj sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola u podlozi (12,5 g/l). Rezultati pokazuju da se najveća vrednost posmatranog odziva postiže kada je količina  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u podlozi najmanja iz ispitivanog opsega (0,25 g/l) a sadržaj  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  se kreće u interval od 1,8 g/l do 2,6 g/l.



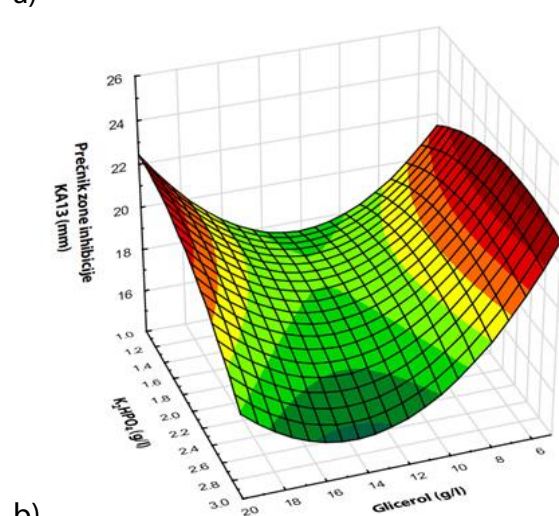
a)



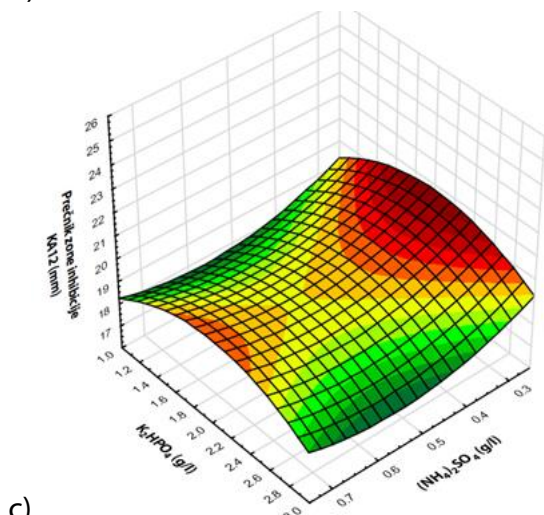
a)



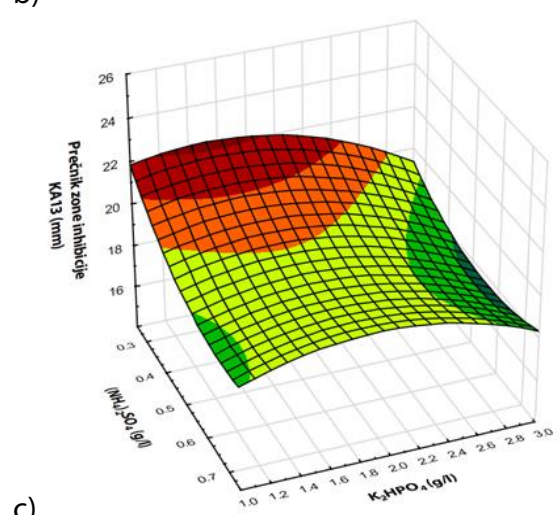
b)



b)



c)



c)

Slika 5.10. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

- a)  $K_2HPO_4$ ;
- b)  $(NH_4)_2SO_4$ ;
- c) glicerol

Slika 5.11. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA13 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

- a)  $K_2HPO_4$ ;
- b)  $(NH_4)_2SO_4$ ;
- c) glicerol

Regresiona jednačina za prečnik zona inhibicije test izolata *F. avenaceum* KA13 prikazana je u tabeli 5.16. Od linearnih članova jednačine statistički značajni su koeficijenti sadržaja glicerola i fosfata, dok svi kvadratni članovi pokazuju statističku značajnost ( $p < 0,05$ ) što je slučaj i sa prethodno testiranim *Fusarium* izolatom. Od članova jednačine koji opisuju uticaj interakcije dva nutrijenta pri konstantnom sadržaju trećeg u podlozi, statistički značajne su interakcije glicerola sa  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  što se takođe podudara sa rezultatima dobijenih kod prethodno ispitivanog *Fusarium* izolata. S obzirom na značajnu podudarnost rezultata dobijenih u tabeli 5.16. koji se odnose na izolate vrste *F. avenaceum*, može se pretpostaviti da isti antagonistički agens produkovan kultivacijom *S. hygroscopicus* pod tačno definisanim uslovima, pokazuje delovanje na oba izolata ove vrste formirajući željene prečnike zona inhibicije rasta micelije.

Posmatrajući odzivnu površinu (slika 5.11. (a)) koja prikazuje modelom predviđen uticaj glicerola i amonijumove soli na prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13 pri konstantnoj vrednosti  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , može se zaključiti da se najmanje vrednosti posmatranog odziva javljaju kada se primene srednje vrednosti glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  iz ispitivanog opsega. Međutim, primena najmanje količine glicerola iz ispitivanog opsega i najveće količine azota iz ispitivanog opsega i obrnuto, utiče na formiranje najvećih prečnika zona inhibicije ispitivanog test fitopatogenog izolata. Ovi rezultati pokazuju da primena jednog od nutrijenata u najmanjoj količini iz ispitivanog opsega verovatno limitira umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma i time utiče na brži ulazak u stacionarnu fazu u kojoj dolazi do produkcije željenih antagonističkih agenasa.

Modelom predviđen uticaj interakcije izvora ugljenika i izvora fosfata na prečnik zone inhibicije rasta micelije izpolata *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj vrednosti izvora azota u podlozi za kultivaciju (slika 5.11. (b)) pokazuje da se najveća vrednost posmatranog odziva javlja u podlozi koja sadrži 20 g/l glicerola i 1 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Takođe, kada je sadržaj glicerola u podlozi 5 g/l, sadržaj fosfata nema značajan uticaj na posmatrani odziv a dobijeni prečnici zone inhibicije rasta micelije testiranog izolata pokazuju visoke vrednosti. I u ovom slučaju može se zaključiti da srednje primenjene vrednosti izvora uljenika u podlozi daju nazadovoljavajuće vrednosti posmatranog odziva.

Slika 5.11. (c) prikazuje modelom predviđen uticaj sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA13 pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola u podlozi (12,5 g/l). Grafički prikazani rezultati pokazuju da se najveće vrednosti posmatranog odziva javljaju kada je u podlozi prisutna najmanja količina  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  iz ispitivanog opsega (0,25 g/l) dok sadržaj  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  može da varira od 1,2 g/l do 1,9 g/l. Dalje povećanje sadržaja fosfata u podlozi rezultuje smanjenju prečnika zone inhibicije rasta micelije testiranog fitopatogenog izolata.

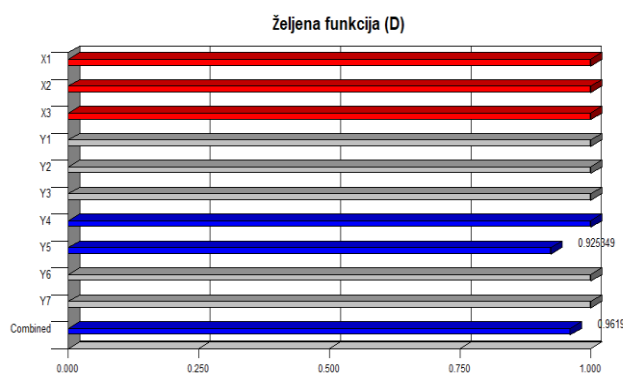
### 5.8.3. OPTIMIZACIJA SASTAVA PODLOGE

U cilju postizanja maksimalne produktivnosti proizvodnog mikroorganizma, u praktičnim uslovima sastav hranljive podloge je neophodno optimizovati, pratiti uticaj sastava hranljive podloge, količine i koncentracije pojedinačnih supstrata na prinos proizvoda. Optimizacija sastava hranljive podloge omogućena je poznavanjem fiziologije i metabolizma proizvodnih organizama. U postupku optimizacije najčešće se primenjuju metodi statističkog planiranja u kojima je najznačajniji parametar prinos proizvoda (Baras i sar., 2009). Za optimizaciju procesa sa više od jednog odziva moguće je primeniti više optimizacionih postupaka, ali je najčešće u primeni koncept željene funkcije (desirability function). Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija i kreće se u intervalu od 0 do 1 (Jokić, 2010) (slike 5.12.-5.15). Visoke vrednosti D pokazuju najbolje vrednosti funkcija u sistemu koje odgovaraju optimalnom rešenju posmatranog sistema. U ovom radu pojam željena funkcija korišćen je za optimizaciju sadržaja glicerola (X1), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (X2) i K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (X3) u podlozi za proizvodnju antagonista skladišnih patogena jabuke efikasnih na izolate vrste *A. alternata* i *F. avenaceum* primenom *S. hygrosopicus*.

Poznato je da je cilj svakog biotehnoškog postupka dobijanje maksimalne količine željenog proizvoda odgovarajućeg kvaliteta (Dodić, Grahovac, 2013). Za definisane pojedinačne željene funkcije izvršena je optimizacija analiziranih faktora, a optimalne vrednosti ispitivanih parametara i predviđeni odzivi prikazani su na slikama 5.12.-5.14 i tabelama 5.17.-5.19.

Nezavisne promenljive	Uslovi	Optimalne vrednosti
Glicerol (g/l)	u opsegu	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	u opsegu	0,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	u opsegu	1,47
Zavisne promenljive		Predviđene vrednosti
Rezidualni glicerol (g/l)	u opsegu	3,1914
Rezidualni azot (g/l)	u opsegu	0,1595
Rezidualni fosfati (g/l)	u opsegu	0,3120
<i>A. alternata</i> KA10 (mm)	maksimalan	31,75
<i>A. alternata</i> T1Jg3 (mm)	maksimalan	34,10
<i>F. avenaceum</i> KA12 (mm)	u opsegu	21,84
<i>F. avenaceum</i> KA13 (mm)	u opsegu	24,57
<b>Ukupna željena funkcija</b>		<b>0,96</b>

Tabela 5.17. Prvi set optimizacije sastava podloge: uslovi i dobijene optimalne vrednosti



Slika 5.12. Prvi set optimizacije sastava podloge: pojedinačne i ukupna željena funkcija

Cilj prvog seta optimizacije bilo je definisanje sastava hranljive podloge koji će obezbediti maksimalnu produkciju antagonista skladišnih patogena roda *Alternaria*. U skladu sa definisanim ciljem kao individualne željene funkcije zadate su maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije na ispitivane skladišne patogene *A. alternata* KA10 (Y4) i *A. alternata*

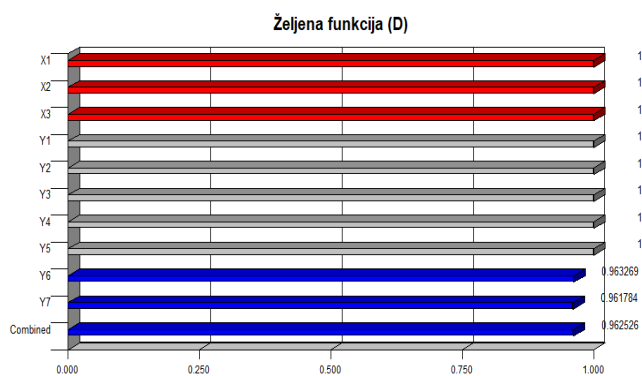


T1Jg3 (Y5) dok su vrednosti ostalih zavisnih kao i nezavisnih promenljivih tražene u opsegu dobijenih odnosno ispitivanih vrednosti. Na slici 5.12. i u tabeli 5.17. prikazane su optimalne vrednosti ispitivanih parametara i predviđeni odzivi kao i pojedinačne i ukupna željena funkcija (D) za prvi set optimizacije. Definisani ciljevi se ostvaruju sa vrednošću ukupne željene funkcije od 0,96 i to pri inicijalnim vrednostima glicerola,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  od 5 g/l; 0,75 g/l i 1,47 g/l, respektivno.

Primenom ovih vrednosti nezavisnih promenljivih dobijaju se maksimalne vrednosti svih individualnih željenih funkcija osim vrednosti pojedinačne željene funkcije za *A. alternata* izolat T1Jg3. Pri definisanom sastavu hranljive podloge predviđene vrednosti prečnika zona inhibicije za izolate *A. alternata* KA10 i T1Jg3 su 31,75 mm i 34,10 mm, respektivno, dok su primenom ovako definisanih ciljeva dobijene predviđene vrednosti prečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 i KA13 od 21,84 mm i 24,57 mm, respektivno. Dobijene predviđene vrednosti sadržaja rezidualnog glicerola (Y1), rezidualnog azota (Y2) i rezidualnog fosfata (Y3) iznose 3,1914 g/l, 0,1595 g/l i 0,3120 g/l, respektivno.

Nezavisne promenljive	Uslovi	Optimalne vrednosti
Glicerol (g/l)	u opsegu	20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	u opsegu	0,27
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (g/l)	u opsegu	1,7
Zavisne promenljive		Predviđene vrednosti
Rezidualni glicerol (g/l)	u opsegu	5,9229
Rezidualni azot (g/l)	u opsegu	0,1774
Rezidualni fosfati (g/l)	u opsegu	0,9585
<i>A. alternata</i> KA10 (mm)	u opsegu	27,27
<i>A. alternata</i> T1Jg3 (mm)	u opsegu	35,00
<i>F. avenaceum</i> KA12 (mm)	maksimalan	24,70
<i>F. avenaceum</i> KA13 (mm)	maksimalan	25,66
<b>Ukupna željena funkcija</b>		<b>0,96</b>

Tabela 5.18. Drugi set optimizacije sastava podloge: uslovi i dobijene optimalne vrednosti



Slika 5.13. Drugi set optimizacije sastava podloge: pojedinačne i ukupna željena funkcija

Na slici 5.13. i u tabeli 5.18. prikazani su rezultati drugog seta optimizacije čiji je cilj bio definisanje sastava hranljive podloge koji će obezbediti maksimalnu produkciju antagonista skladišnih patogena roda *Fusarium*. Stoga su kao ciljevi optimizacije postavljeni maksimalni prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 (Y6) i *F. avenaceum* KA13 (Y7), dok su vrednosti ostalih zavisnih i nezavisnih promenljivih definisane u opsegu. Definisani ciljevi se ostvaruju sa vrednošću ukupne željene funkcije od 0,96 i to pri inicijalnim vrednostima glicerola,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  od 20 g/l; 0,27 g/l i 1,7 g/l, respektivno. Primenom ovih vrednosti nezavisnih promenljivih, pojedinačne željene funkcije za oba ispitana *Fusarium* izolata kao i ukupna željena funkcija imaju vrednosti veće od 0,96. Maksimalne zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 i KA13 pri optimalnim uslovima imaju predviđene vrednost 24,70 mm i 25,66 mm, respektivno.

Istovremeno, dobijene predviđene vrednosti prečnika zona inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 i T1Jg3 iznose 27,27 mm i 35 mm, respektivno.

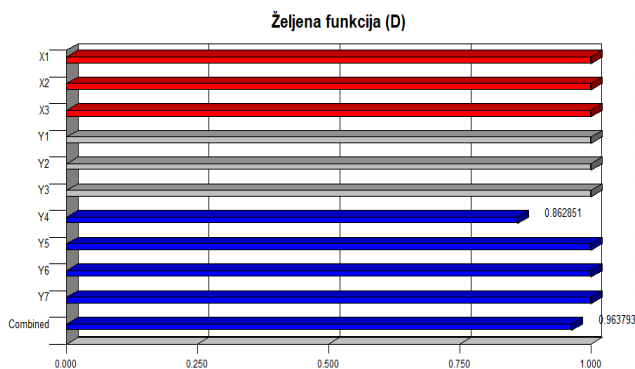
Analizom prvog i drugog seta optimizacije uočava se da je za postizanje maksimalnih prečnika zona inhibicije rasta micelije testiranih izolata, neophodno primeniti hranljive podloge čiji se sastav značajno razlikuje. Posmatrajući neophodan sadržaj glicerola uočava se da optimalna vrednost za dobijanje maksimalnih zona inhibicije rasta micelije izolata vrste *A. alternata* iznosi 5 g/l, dok je za izolate vrste *F. avenaceum* čak 20 g/l, međutim u podlozi sa više glicerola je potreba za izvorom azota čak tri puta manja u odnosu na hranljivu podlogu koja pogoduje *Alternaria* izolatima a koja sadrži manje glicerola. Ovi rezultati pokazuju da na izolate vrste *A. alternata* i *F. avenaceum* najverovatnije deluju različite aktivne komponente, čija se maksimalna produkcija ostvaruje kultivacijom *S. hygroscopicus* pri različitom sastavu hranljive podloge.

Svakako, da bi se dobile optimalne vrednosti sastava podloge sa ciljem maksimalne produkcije antagonista skladšnih pathogena oba roda, neophodno je uraditi treći set optimizacije gde su kao individualne željene funkcije definisani maksimalni prečnici zona inhibicije rasta micelije sva četiri ispitivana izolata dok su vrednosti ostalih zavisnih i nezavisnih promenljivih definisane u opsegu.

Na slici 5.14. i u tabeli 5.19. prikazani su rezultati trećeg seta optimizacije. Rezultati pokazuju da primenom inicijalnih vrednosti glicerola,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  od 20 g/l; 0,25 g/l i 1,41 g/l, respektivno, pojedinačne željene funkcije za prečnike zona inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3, *F. avenaceum* KA12 i KA13 iznose 1, dok je vrednost za izolat *A. alternata* KA10 manja i iznosi 0,86. S obzirom da su optimalne vrednosti sastava podloge dobijene u drugom i trećem setu optimizacije vrlo slične, može se zaključiti da ovako dobijena podloga više pogoduje produkciji aktivnih komponenti efikasni na izolate roda *Fusarium* te nije čudno što je izolat *A. alternata* KA10 pri ovim uslovima pokazao manju osetljivost (28,22 mm) na delovanje supernatanta kultivacione tečnosti dobijene po završetku bioprocasa, dok je predviđeni prečnik zone inhibicije na izolat *A. alternata* T1Jg3 pri istim uslovima čak i veći nego u prvom setu optimizacije i iznosi 36,86 mm. Generalno, kada se uporede vrednosti prečnika zona inhibicije koje su predviđene u prva tri seta optimizacije uočava se da se vrednosti razlikuju za maksimalno  $\pm 4,48$  mm,  $\pm 2,76$  mm,  $\pm 3,70$  mm i  $\pm 2,21$  mm za izolate *A. alternata* KA10, *A. alternata* T1Jg3, *F. avenaceum* KA12 i *F. avenaceum* KA13, respektivno. Ovako dobijena relativno mala odstupanja ukazuju na opravdanost primene hranljive podloge čiji je sastav definisan trećim setom optimizacije jer se u istom bioprocasu simultano proizvode antagonistički agensi efikasni na izolate skladišnih patogena oba ispitivana roda. S druge strane, definisani sastavi hranljivih podloga za dobijanje supernatanta kultivacione tečnosti sa takvim delovanjima se značajno razlikuju, a posledično i sadržaj rezidualnog glicerola, azota i fosfata.

Nezavisne promenljive	Uslovi	Optimalne vrednosti
Glicerol (g/l)	u opsegu	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	u opsegu	0,25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	u opsegu	1,41
Zavisne promenljive		Predviđene vrednosti
Rezidualni glicerol (g/l)	u opsegu	5,3418
Rezidualni azot (g/l)	u opsegu	0,1930
Rezidualni fosfati (g/l)	u opsegu	0,8601
<i>A. alternata</i> KA10 (mm)	maksimalan	28,22
<i>A. alternata</i> T1Jg3 (mm)	maksimalan	36,86
<i>F. avenaceum</i> KA12 (mm)	maksimalan	25,54
<i>F. avenaceum</i> KA13 (mm)	maksimalan	26,78
<b>Ukupna željena funkcija</b>		<b>0,96</b>

Tabela 5.19. Treći set optimizacije sastava podloge: uslovi i dobijene optimalne vrednosti



Slika 5.14. Treći set optimizacije sastava podloge: pojedinačne i ukupna željena funkcija

Shodno tome da se u nastavku istraživanja ispituje delovanje kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus* na sva četiri skladišna patogena jabuke rodova *Alternaria* i *Fusarium*, u daljim ogledima biće primenjene optimalne količine glicerola, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dobijene u trećem setu optimizacije. Dakle, u daljim istraživanjima biće korišćena podloga koja sadrži 20 g/l glicerola, 0,25 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1,41 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Pored ova tri najvažnija nutrijenta, podloga sadrži i sledeće komponente (g/l): CaCO<sub>3</sub> (3,0), NaCl (3,0) i MgSO<sub>4</sub> (0,5).

## 5.9. ISPITIVANJE UTICAJA ODABRANIH PROCESNIH PARAMETARA NA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

Informacije dostupne u naučno literaturi pokazuju da su se naučnici u svetu i kod nas uglavnom bavili ispitivanjima proizvodnje aktivnih metabolita streptomoceta u malim zapreminama (nivo erlenmajera) (Chen i sar, 2011; Jonsbu i sar, 2002; Schrader i Blevins) međutim, istraživanja o uslovima proizvodnje u laboratorijskom bioreaktoru vrlo su retka i ukoliko su rađena uglavnom su patentom zaštićena ili predstavljaju proizvođačku tajnu. Upravo korak prelaska sa nivoa erlenmajera na nivo laboratorijskog bioreaktora predstavlja kritičan korak u razvoju bioprocesa jer podrazumeva značajnu promenu uslova izvođenja. U ovom koraku dolazi do prelaska sa eksternog na interno mešanje koje je potrebno precizno definisati, kao i prelaska sa spontane na aeraciju sterilnim vazduhom ili kiseonikom čiji je intenzitet takođe potrebno definisati.

Aeracija i mešanje su krlični parametri koji učestvuju u procesu *scale-upa* i imaju značajan uticaj u određivanju produktivnosti bioprocesa. Odgovarajući intenzitet aeracije i mešanja u fermentoru po pravilu omogućava bolje prinose u odnosu na one dobijene u erlenmajerima odnosno malim razmerama. Definisane adekvatnih uslova aeracije i mešanja moglo bi da utiče na dobijanje maksimalnih prinosa željenih antagonističkih

agenasa a istovremeno skрати vreme trajanja bioprocesa čime bi doprinelo smanjenju troškova proizvodnje.

U ovom segmentu razvoja bioprocesa neophodno je definisati intenzitet aeracije i mešanja koji će omogućiti održavanje uniformnih i adekvatnih uslova u čitavoj zapremini bioreaktora što za cilj ima maksimizaciju prinosa željenih antagonista skladišnih patogena jabuke. Eksperimenti iz ove faze istraživanja izvedeni su u bioreaktoru (Biostat Aplus, Sartorius AG, Germany) zapremine 3l, radne zapremine 2l sa internim mešanjem pomoću dve paralelno postavljene Ruštonove turbine na prethodno optimizovanoj podlozi (poglavlje 5.8.3).

### 5.9.1. TOKOVI KULTIVACIJE IZVEDENI U BIOREAKTORU PRI RAZLIČITIM INTENZITETIMA AERACIJE I MEŠANJA

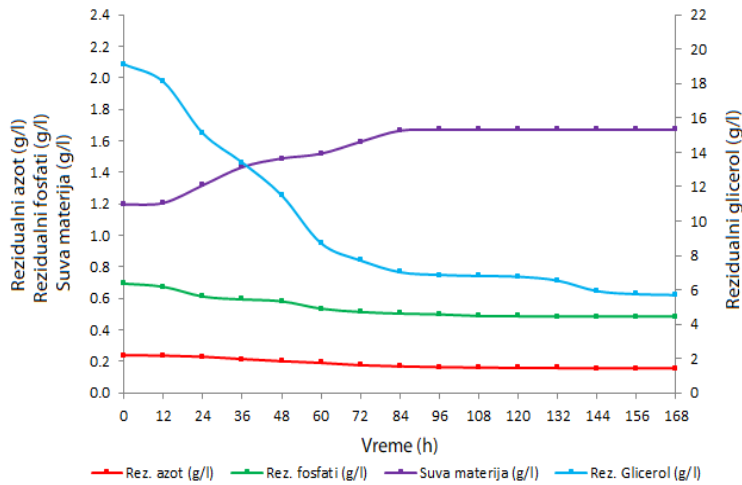
Nutritivni zahtevi i uslovi sredine značajno utiču na proizvodnju sekundarnih metabolita streptomiceta, a najznačajniji činioci su svakako izvor ugljenika, izvor azota, mineralne materije, koncentracija kiseonika, osmotski pritisak, pH podloge, temperatura i vreme inkubacije (Ripa i sar, 2009; Sing i Rai, 2012; Elbol, 2004).

Aeracija i mešanje igraju veoma važnu ulogu u submerznim kultivacijama u kojima se koriste aerobni proizvodni mikroorganizami jer značajno utiču na sadržaj i dostupnost rastvorenog kiseonika u podlozi (Gottschalk i sar, 2003; Techapun i sar, 2003). Optimalna brzina mešanja je posebno važna za postizanje maksimalne produktivnosti obzirom da neodgovarajuća brzina mešanja može da dovede do niza štetnih efekata po proizvodni mikroorganizam a samim tim utiče i na smanjenu produktivnost (Nigam i sar, 2012).

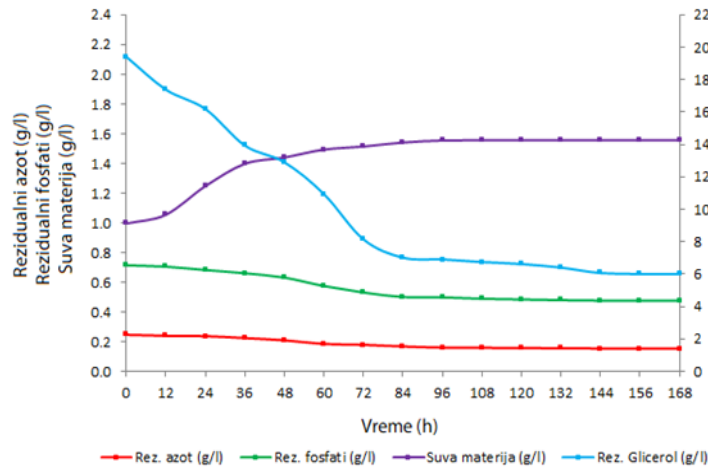
S druge strane, veća brzina mešanja povećava količinu rastvorenog kiseonika i doprinosi boljem rastu proizvodnog mikroorganizma (Feng i sar, 2002). Međutim, ruptura ćelija, sporiji rast, promene u ćelijskoj morfologiji su samo neke od neželjenih pojava koje mogu da budu posledica primene brzine mešanja veće ili manje od optimalne (Nigam i sar, 2012; Shioya i sar, 1999). Poznato je da je forma sitnijih peleta najpovoljniji oblik proizvodnje metabolita primenom streptomiceta (Ilić i sar, 2008). Na slikama 5.15.-5.17. prikazani su tokovi kultivacije bioprocesa u bioreaktoru pri mešanju od 100, 200 i 300 o/min, respektivno i intenzitetu aeracije od 0,5 l/l/min (a), 1 l/l/min (b) i 1,5 l/l/min (c) primenom *S. hygrosopicus*.

Slika 5.15. (a) prikazuje potrošnu najznačajnijih nutrijenata i porast biomase tokom 7 dana trajanja kultivacije *S. hygrosopicus* u laboratorijskom bioreaktoru pri brzini mešanja 100 o/min i intenzitetu aeracije 0,5 l/l/min. Posmatrajući krivu potrošnje glicerola može se zaključiti da se ovaj nutrijent intenzivno troši od prvih sati kultivacije do 84 h kultivacije nakon čega se trend intenzivne potrošnje smanjuje te se glicerol do kraja bioprocesa troši značajno manjim intenzitetom.

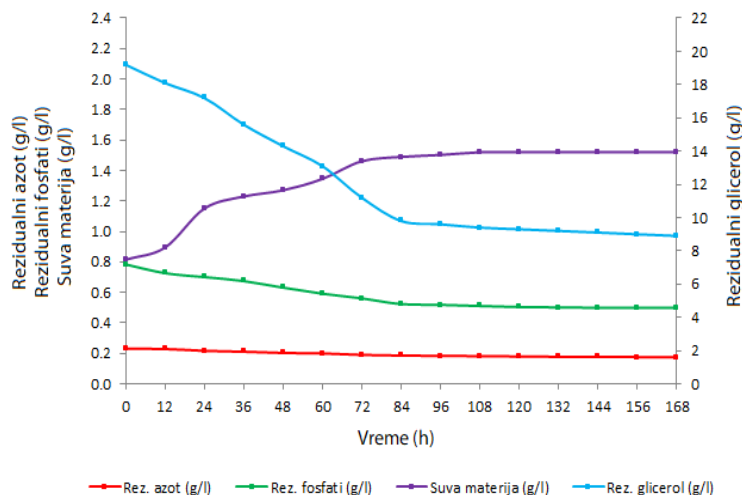
a)



b)



c)



Slika 5.15. Tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 100 o/min i intenzitetom aeracije

a) 0,5 l/l/min

b) 1 l/l/min

c) 1,5 l/l/min

S druge strane, kriva potrošnje izvora azota i fosfata tokom kultivacije pokazuje veoma sličan trend. Naime, tokom prva 84 h kultivacije azot i fosfati se intenzivno troše da bi do kraja bioprocesa intenzitet potrošnje oba nutrijenta bio znatno smanjen. Rezidualne vrednosti glicerola, azota i fosfata u 168 h kultivacije iznose 5,7 g/l, 0,157 g/l i 0,485 g/l, respektivno. Ovakav rezultat potvrđuje činjenicu da se izvori ugljenika, azota i fosfata kao najznačajnijih nutrijenata intenzivno troše tokom eksponencijalne faze, odnosno faze rasta mikroorganizma nakon čega se njihov sadržaj neznatno menja što ukazuje na ulazak u stacionarnu fazu (Tadijan i sar, 2016). Promena sadržaja suve materije kultivacione tečnosti je indirektan pokazatelj promene sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma. Sa krive se može uočiti da se količina suve materije neznatno povećala tokom prva 24 časa kultivacije što je očekivano budući da taj period obuhvata lag fazu, fazu adaptacije proizvodnog mikroorganizma na novonastale uslove sredine. Nakon 24 h sledi eksponencijalno povećanje

sadržaja suve materije do 84 h kultivacije nakon čega sadržaj suve materije dostiže vrednost koja praktično stagnira do kraja bioprocesa kada dostiže vrednost 1,671 g/l. Upravo ovakav trend promene suve materije je u saglasnosti sa promenom sadržaja ispitivanih nutrijenata tokom bioprocesa.

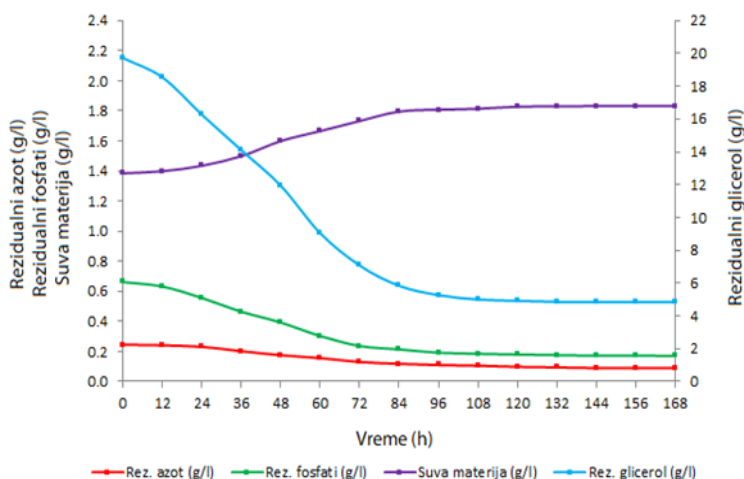
Na slici 5.15. (b) prikazan je tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja 100 o/min i intenzitetom aeracije 1 l/l/min. Praćenjem toka potrošnje sva tri nutrijenta uočava se da se njihova intenzivna potrošnja završava nakon trećeg dana kultivacije nakon čega proizvodni mikroorganizam ulazi u stacionarnu fazu rasta. Rezidualne vrednosti glicerola, azota i fosfata na kraju bioprocesa iznose 6 g/l, 0,153 g/l i 0,475 g/l, respektivno. S obzirom da je količina suve materije indirektan pokazatelj rasta biomase i usko je povezana sa potrošnjom supstrata, može se uočiti da je njen porast najintenzivniji u prvih 36 h nakon čega ulazi u stacionarnu fazu rasta u kojoj joj količina praktično stagnira do kraja bioprocesa kada dostiže vrednost od 0,156 g/l.

Slika 5.15. (c) opisuje tok potrošnje glicerola, azota i fosfata kao i porast biomase tokom 7 dana trajanja kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja 100 o/min i intenzitetom aeracije 1,5 l/l/min. Rezultati pokazuju da se biomasa ćelija intenzivno povećava do 72 h nakon čega se brzina rasta značajno smanjuje da bi na kraju bioprocesa sadržaj biomase ćelija imao vrednost 1,520 g/l. U skladu sa porastom biomase ćelija tekla je i potrošnja najznačajnijih nutrijenata. Krive potrošnje pokazuju trend intenzivne potrošnje tokom prvih tri dana kultivacije nakon čega se izvor ugljenika, azota i fosfora troši do kraja bioprocesa ali znatno sporije. Rezidualne vrednosti ova tri nutrijenta na kraju bioprocesa iznose 8,9 g/l, 0,175 g/l i 0,498 g/l, respektivno.

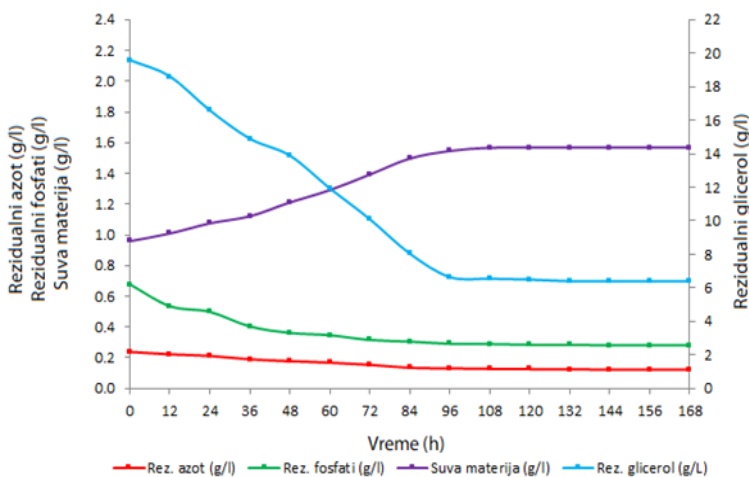
Analizom rezultata dobijenih u bioreaktoru pri brzini mešanja od 100 o/min može se zaključiti da porastom intenziteta aeracije, mikroorganizam ranije ulazi u stacionarnu fazu gde dolazi do produkcije željenih antagonističkih agenasa što se poklapa sa rezultatima dobijenim u istraživanju Gottschalk i saradnika (Gottschalk i sar, 2003). Istovremeno, skraćanjem eksponencijalne faze dolazi do proizvodnje manje biomase ćelija a u skladu sa tim se troši i manje nutrijenata u podlozi.

Slika 5.16. (a) prikazuje uticaj brzine mešanja od 200 o/min i intenziteta aeracije 0,5 l/l/min na potrošnju glicerola, azota i fosfata u podlozi za proizvodnju antagonista skladišnih patogena jabuke u bioreaktoru, primenom *S. hygroscopicus*. Posmatranjem kriva potrošnje sva tri nutrijenta može se zaključiti da se intenzivna potrošnja uočava do 84 h kultivacije nakon čega se nutrijenti do kraja bioprocesa i dalje troše ali nešto manjom brzinom. U skladu sa ovim, porast biomase ćelija je najintenzivniji do četvrtog dana nakon čega se usporava da bi do kraja bioprocesa imala vrednost 1,832 g/l. Međutim, tokom prvih sati bioprocesa, sadržaj ovog pokazatelja se neznatno menja što može biti posledica *lag* faze, faze adaptacije mikroorganizma na nove uslove sredine. Rezidualne vrednosti izvora ugljenika, azota i fosfora na kraju bioprocesa spuštaju se do vrednosti od 4,84 g/l, 0,089 g/l i 0,171 g/l, respektivno.

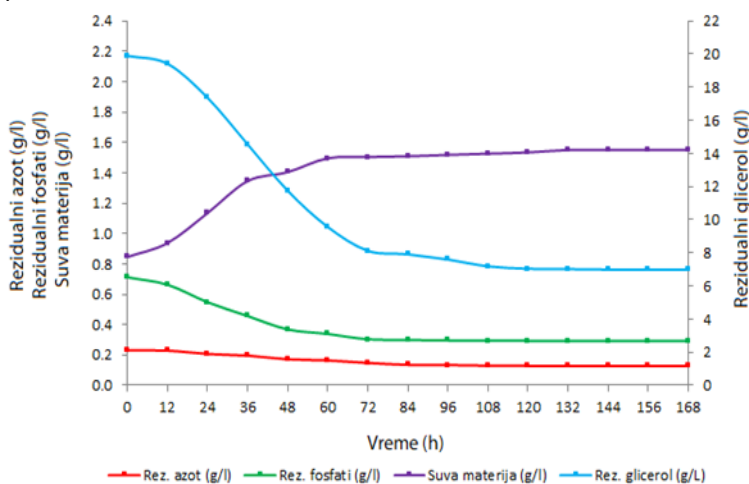
a)



b)



c)



Slika 5.16. Tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 200 o/min i intenzitetom aeracije

- a) 0,5 l/l/min
- b) 1 l/l/min
- c) 1,5 l/l/min

Tok potrošnje tri, za mikroorganizam najvažnija nutrijenta tokom 168 h trajanja bioprocasa i promena sadržaja biomase ćelija pod uslovima mešanja 200 o/min i intenziteta aeracije 1 l/l/min u laboratorijskom bioreaktoru, prikazana je na slici 5.16. (b). Posmatrajući krive potrošnje glicerola, azota i fosfata može se zaključiti da eksponencijalna faza traje do 84 h kultivacije nakon čega nastupa stacionarna faza u kojoj je potrošnja osnovnih nutrijenata znatno usporenija da bi na kraju bioprocasa imala vrednosti od 6,4 g/l, 0,122 g/l i 0,282 g/l, respektivno. Istovremeno, sadržaj suve materije, kao direktni pokazatelj sadržaja biomase ćelija, na kraju bioprocasa dostiže vrednost od 1,569 g/l.

Uticaj brzine mešanja od 200 o/min i intenziteta aeracije od 1,5 l/l/min na tok kultivacije *S. hygroscopicus*, prikazan je na slici 5.16. (c). U poređenju sa prethodna dva primenjena intenziteta aeracija, pod ovim uslovima eksponencijalna faza se završava nešto ranije. Naime, praćenjem krivi potrošnje supstrata ali i krive porasta biomase ćelija može se

zaključiti da se eksponencijalna faza rasta završava tokom trećeg dana kultivacije kada počinje stacionarna faza. Sadržaj glicerola nakon 72 h kultivacije i dalje opada smanjenim intenzitetom do kraja bioprocesa kada dostiže vrednost 6,99 g/l. S obzirom da je izvor ugljenik u podlogama potreban ćelijama mikroorganizama za sintezu delova ćelije i kao izvor energije, očekivano je da se ovaj nutrijent intenzivno troši u prvim satima bioprocesa odnosno, tokom eksponencijalne faze rasta. Podaci iz naučne literature potvrđuju činjenicu da ovaj izvor ugljenika značajno utiče, kako na rast ćelija proizvodnog mikroorganizma, tako i na produkciju željenih agenasa (Sinhg i sar, 2008) međutim, Shioya i saradnici u svom istraživanju nisu došli do ovih zaključaka (Shioya i sar, 1999). Sličan trend potrošnje javlja se i kod azota i fosfata pri čemu se njihove vrednosti do kraja bioprocesa smanjuju na 0,127 g/l i 0,292 g/l, respektivno.

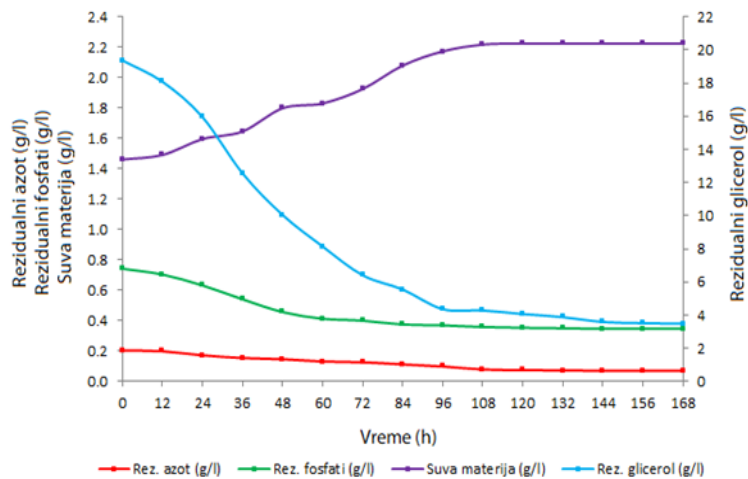
Rezimirajući rezultate sva tri bioprocesa izvedena u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 200 o/min i intenzitetima aeracije 0,5 l/l/min, 1 l/l/min i 1,5 l/l/min, može se zaključiti da porastom intenziteta aeracije, proizvodni mikroorganizam ranije ulazi u stacionarnu fazu. Kao posledica svega navedenog dolazi do toga da se pri nižim intenzitetima aeracije troši više nutrijenata iz podloge za rast biomase ćelija te su rezidualne vrednosti ispitana tri nutrijenta na kraju bioprocesa veće kod većih intenziteta aeracije nego kod manjih (Gottschalk i sar, 2003). Istovremeno, kod intenziteta aeracije od 0,5 l/l/min eksponencijalna faza traje duže pa je i sadržaj suve materije veći, dok je kod intenziteta aeracije od 1,5 l/l/min sadržaj suve materije na kraju bioprocesa nešto manji obzirom da je eksponencijalna faza skraćena za jedan dan.

S druge strane, poređenjem rezultata dobijenih u eksperimentima u bioreaktoru sa mešanjem 100 o/min i eksperimentima sa mešanjem 200 o/min, možemo zaključiti da postoji izvesna sličnost. U oba slučaja sa povećanjem aeracije smanjuje se količina proizvedene biomase ćelija jer mikroorganizam ranije ulazi u stacionarnu fazu u kojoj ne dolazi do intenzivnog rasta ćelija već je akcenat na produkciji sekundarnih metabolita (Liang i sar, 2008). Takođe, potrošnja nutrijenata je veća pri nižim intenzitetima aeracije što doprinosi većem sadržaju suve materije. Analizom rezultata dobijenih pri različitim brzinama mešanja može se zaključiti da je potrošnja nutrijenata veća pri većoj brzini mešanja što se podudara sa rezultatima drugih naučnika (Yen i Hsiao, 2013; Mitrović i sar, 2017).

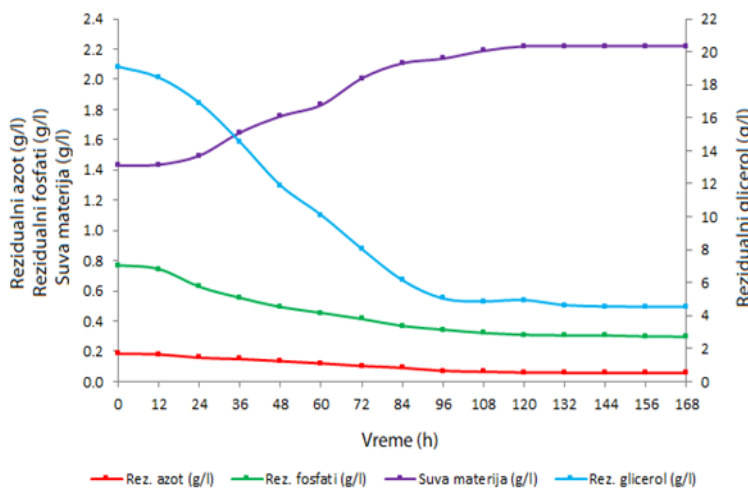
Na slici 5.17. (a) prikazan je tok kultivacije *S. hygrosopicus* u bioreaktoru sa brzinom mešanja 300 o/min i protokom vazduha od 0,5 l/l/min. Rezultati toka kultivacije praćeni preko krivi potrošnje nutrijenata i sadržaja suve materije pokazuju da eksponencijalna faza traje do 108 h bioprocesa kada mikroorganizam polako ulazi u stacionarnu fazu rasta. Tokom eksponencijalne faze rasta, mikroorganizam troši izvor ugljenika, azota i fosfora u velikim količinama da bi na kraju bioprocesa zaostale količine ovih nutrijenata bile veoma niske: 3,48 g/l, 0,070 g/l i 0,346 g/l, respektivno. Analizom krive porasta suve materije može se uočiti da se u prvih 12 h kultivacije sadržaj ovog pokazatelja neznatno menja što ukazuje



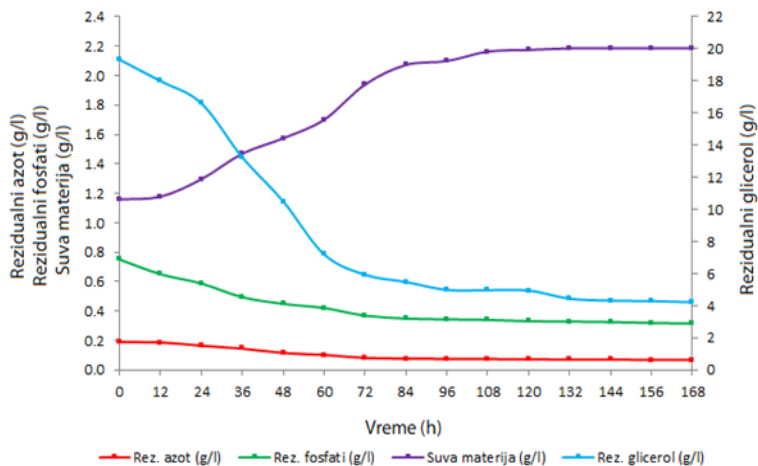
a)



b)



c)



Slika 5.17. Tok kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja od 300 o/min i intenzitetom aeracije

a) 0,5 l/l/min

b) 1 l/l/min

c) 1,5 l/l/min

da se mikroorganizam pod ovim uslovima kultivacije postepeno prilagođava na novonastale uslove sredine. U skladu sa potrošnjom supstrata, sadržaj suve materije dostiže vrednost od 2,224 g/l na kraju bioprocasa.

Tok potrošnje nutrijenata i porast biomase ćelija kod bioreaktora sa brzinom mešanja 300 o/min i intenzitetom aeracije 1 l/l/min primenom *S. hygroscopicus*, prikazan je na slici 5.17. (b). Posmatrajući krivu porasta suve materije može se zaključiti da trend intenzivnog porasta traje do 96 h kultivacije nakon čega se postepeno usporava do kraja bioprocasa kada sadržaj suve materije dostiže vrednost 2,220 g/l. Istovremeno, glicerol se intenzivno troši do 96 h kultivacije da bi do kraja bioprocasa zaostalo 4,53 g/l ovog nutrijenta. Potrošnja izvora azota i fosfata je u skladu sa potrošnjom glicerola. Trend intenzivne potrošnje ova dva nutrijenta traje do 96 h kultivacije nakon čega se značajno usporava zbog ulaska mikroorganizma u stacionarnu fazu rasta.

Rezidualne vrednosti azota i fosfata nakon 7 dana kultivacije iznose 0,057 g/l i 0,298 g/l, respektivno.

Slika 5.17. (c) prikazuje potrošnju izvora ugljenika, azota i fosfata, kao i promenu sadržaja suve materije tokom 7 dana trajanja kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru sa brzinom mešanjem 300 o/min i intenzitetom aeracije 1,5 l/l/min primenom proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus*. Rezultati prikazani na grafiku pokazuju da eksponencijalna faza rasta traje do 84 h kultivacije kada se potrošnja svih nutrijenata značajno smanjuje a rast ćelija se istovremeno značajno usporava. Rezidualne vrednosti glicerola, azota i fosfata na kraju bioprocesa iznose 4,22 g/l, 0,068 g/l i 0,315 g/l, respektivno, dok je sadržaj suve materije u 168 h iznosio 2,1860 g/l.

Analizom rezultata dobijenih u prethodnim eksperimentima sa različitom brzinom mešanja, može se uočiti da su pri mešanju od 300 o/min uočene najveće količine nastale biomase a samim tim je i potrošnja nutrijenata u ovim bioprocesima bila najveća.

Ovo je očekivano obzirom da je u ovim bioprocesima eksponencijalna faza trajala najduže. Sa druge strane, najmanja količina proizvedene biomase registruje se u bioprocesima rađenim u bioreaktoru sa brzinom mešanja 100 o/min što se poklapa sa rezultatima Nigam i saradnika (Nigam i sar, 2012). Takođe, tokom izvođenja bioprocesa sa brzinom mešanja 300 o/min uočen je nešto kasniji ulazak proizvodnog mikroorganizma u stacionarnu fazu u odnosu na bioprocese rađene pri brzini mešanja 100 i 200 o/min. Ovi rezultati poklapaju se sa rezultatima Gottschalk i saradnika (2003) i Feng i sar (2002) koji su utvrdili da povećanje brzine mešanja značajno doprinosi da kiseonik i nutrijenati postanu bolje dostupni proizvodnom mikroorganizmu, što značajno utiče na porast biomase ćelija (Gottschalk i sar, 2003; Feng i sar, 2002).

Kada analiziramo uticaj intenziteta aeracije na potrošnju supstrata i porast biomase ćelija biokatalizatora, uočava se da kod svih kultivacija rađenih sa protokom vazduha 0,5 l/l/min u prvim satima kultivacije postoji *lag* faza. Ovo može da znači da je pri ovim uslovima kultivacije proizvodnom mikroorganizmu potrebno vreme da se prilagodi novonastalim uslovima u bioreaktoru što može biti posledica smanjene količine dostupnog kiseonika u podlozi za kultivaciju. Takođe, porastom intenziteta aeracije proizvodni mikroorganizam *S. hygroscopicus* ranije ulazi u stacionarnu fazu, fazu u kojoj dolazi do produkcije sekundarnih metabolita, antagonista skladišnih patogena jabuke. Sa druge strane, raniji ulazak u stacionarnu fazu skraćuje trajanje eksponencijalne faze, faze rasta proizvodnog mikroorganizma, što rezultira smanjenju sadržaja biomase ćelija. Istovremeno, povećanje intenziteta aeracije dovodi do povećanja produkcije željenih antagonističkih agenasa primenom *S. hygroscopicus*, pa se uočava da su, bez obzira na intenzitet mešanja, svi reaktori sa intenzitetom aeracije 1,5 l/l/min dali najveće prinose. Ovaj zaključak poklapa se sa rezultatima istraživanja Yen i Li koji su utvrdili da najveća količina proizvoda dobijena kultivacijom *S. hygroscopicus*, nastaje upravo primenom ovog intenziteta aeracije (Yen i Li, 2014).

### 5.9.2. PROIZVODNJA ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE TOKOM KULTIVACIJA IZVEDENIH U BIOREAKTORU PRI RAZLIČITIM INTENZITETIMA AERACIJE I MEŠANJA

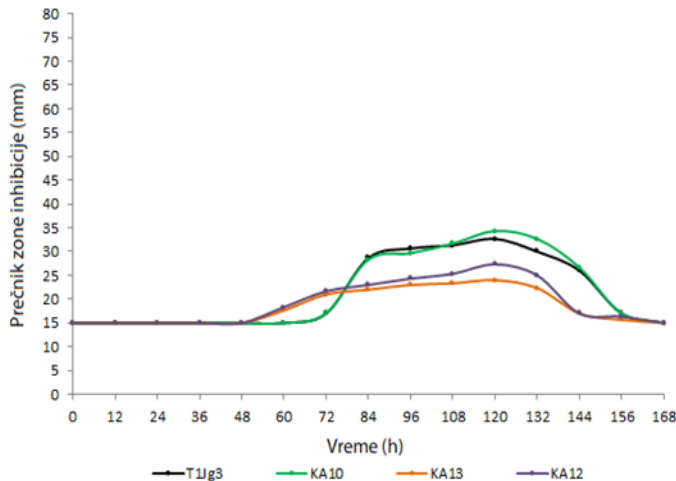
U nastavku istraživanja ispitano je delovanje supernatanta kultivacionih tečnosti dobijenih uzorkovanjem na svakih 12 h u bioprocesima izvođenim pri različitim intenzitetima aeracije i mešanja u laboratorijskom bioreaktoru primenom *S. hygroscopicus* na test fitopatogene izolate vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*.

Delovanje supernatanta kultivacione tečnosti na četiri izolata skladišnih patogena jabuke, dva vrste *A. alternata* (T1Jg3 i KA10) i dva vrste *F. avenaceum* (KA12 i KA13) ispitano je na svakih 12 h kultivacije difuzionom metodom sa bunarima. Rezultati eksperimenata prikazani su na slikama 5.18.-5.20. Na graficima su predstavljeni rezultati prečnika zone inhibicije koji su dobijeni kao srednja vrednost tri ponavljanja. Istraživanja rađena u bioreaktoru primenom *S. hygroscopicus* na podlozi koja sadrži sojino brašno i glukozu kao izvore azota i ugljenika (poglavlje 5.6.) utvrđeno je da su za aktivno delovanje na testirane fitopatogene gljive odgovorni ekstracelularni antifungalni metaboliti prisutni u supernatantu kultivacione tečnosti (Tadijan i sar, 2016).

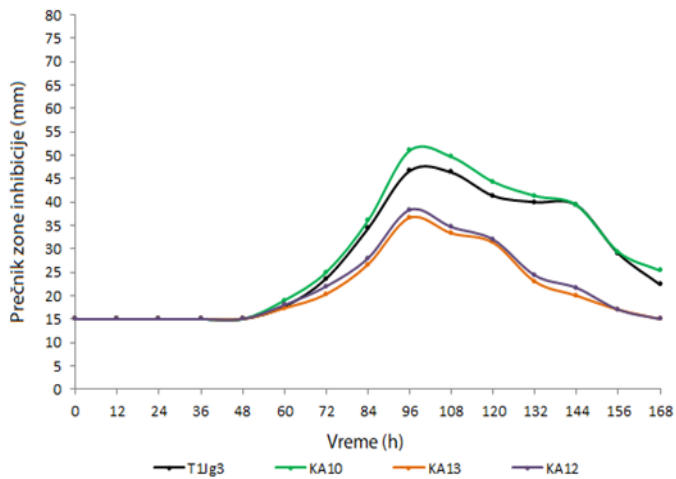
Na slici 5.18. (a) prikazana je proizvodnja antagonističkih agenasa tokom 7 dana trajanja bioprocesa u bioreaktoru sa brzinom mešanja 100 o/min i intenzitetom aeracijom 0,5 l/l/min primenom *S. hygroscopicus*. Sa slike se jasno uočava da do maksimalne produkcije antagonističkih agenasa dolazi u 120 h kultivacije pri čemu najveću zonu inhibicije rasta micelije od 34,33 mm supernatant kultivacione tečnosti formira prema izolatu *A. alternata* KA10, nešto manju osetljivost pokazuje izolat *A. alternata* T1Jg3 sa prečnikom od 32,67 mm dok na *F. avenaceum* KA12 i KA13 formira zonu inhibicije rasta micelije od 27,33 mm i 24 mm, respektivno. Ovi rezultati nam pokazuju da je vrsta *A. alternata* osetljivija na produkovane antagonističke agense u odnosu na vrstu *F. avenaceum*. Takođe, ukoliko se uporede rezultati prikazani na slici 5.18. (a) sa rezultatima prikazanim na slici toka kultivacije bioprocesa pod istim procesnim uslovima (slika 5.15. (a)), može se zaključiti da su najveći prečnici zona inhibicije dobijeni tokom stacionarne faze rasta koja je nastupila nakon 72 h kultivacije. Posmatrajući krivu promenu vrednosti prečnika zona inhibicije rasta micelije može se uočiti da do produkcije dolazi već nakon drugog dana kultivacije *S. hygroscopicus* međutim, produkcija se intenzivira nakon trećeg dana da bi u 120 h količina produkovanih antagonističkih agenasa dostigla svoj maksimum.

S obzirom da mikroorganizmi pod određenim uslovima mogu da proizvode jedan ili više aktivnih metabolita, a u ovom slučaju ispitani su test mikroorganizmi iz dva različita roda, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je za nastale prečnike zona inhibicije zaslužna samo jedna aktivna komponenta. Takođe, iz svega navedenog može se zaključiti da su jedan ili više produkovanih antagonističkih agenasa, sekundarni metaboliti. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima (Tadijan i sar, 2016).

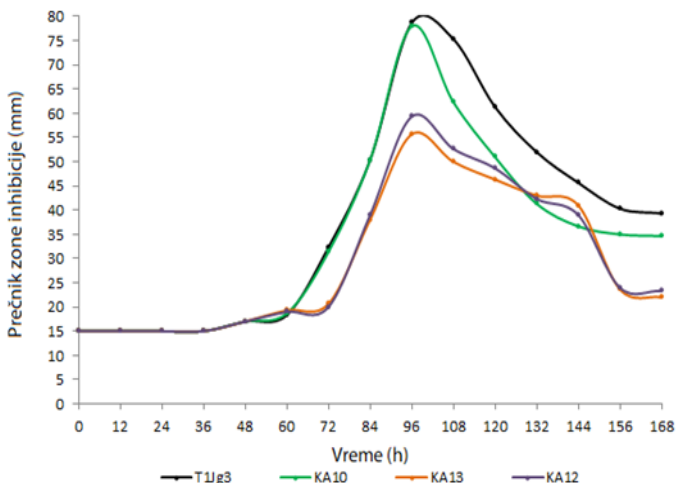
a)



b)



c)



Slika 5.18. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kulture tečnosti u bioreaktoru sa mešanjem 100 o/min i intenzitetom aeracije:  
a) 0,5 l/l/min b) 1 l/l/min c) 1,5 l/l/min

Proizvodnja antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum* u laboratorijskom bioreaktoru sa brzinom mešanja 100 o/min i protokom vazduha 1 l/l/min, prikazana je na slici 5.18. (b). Kao i kod prethodne kultivacije pri mešanju od 100 o/min i aeraciji od 0,5 l/l/min, i ovde najveću osetljivost pokazuju izolati vrste *A. alternata*, KA10 i T1Jg3, sa prečnicima zona inhibicije od 51 mm i 46,67 mm, respektivno. Manju osetljivost na produkovane antagonističke agense pokazuje izolat *F. avenaceum* KA12 sa prečnikom zone inhibicije od 38,33 mm i *F. avenaceum* KA13 od 36,67 mm. Stacionarna faza rasta počinje tokom trećeg dana kultivacije (slika 5.15. (b)), dok se maksimalna aktivnost produkovanih agenasa na sva četiri test izolata registruje u 96 h kultivacije. Nakon 96 h kultivacije, aktivnost antagonističkih agenasa postepeno opada. Međutim, može se zaključiti da povećanje aeracije sa 0,5 l/l/min na 1 l/l/min značajno utiče na povećanje produkcije željenih antagonističkih agenasa. Takođe, povećanjem protoka vazduha dolazi do

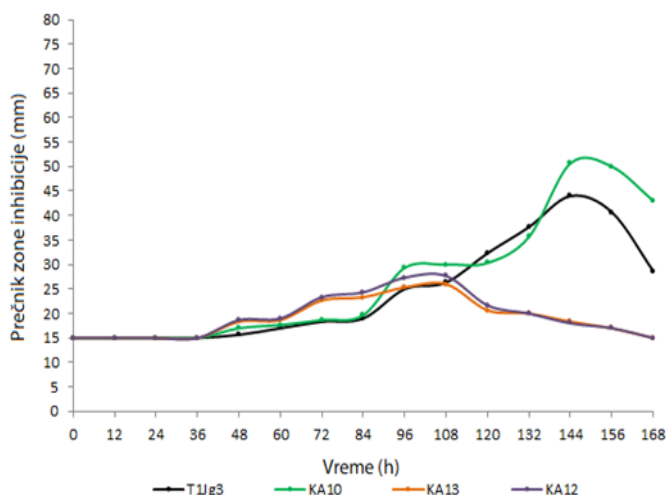
bržeg ulaska mikroorganizma u stacionarnu fazu te se maksimalna produkcija željenih agenasa javlja 24 h ranije u odnosu na bioproces sa nižom aeracijom. Techapun i sar su ispitivali proizvodnju ksilanaze primenom *Streptomyces* sp. Ab 106 pri čemu su došli do sličnog zaključka. Naime, pri istoj brzini mešanja od 150 o/min i povećanju intenziteta aeracije od 0 do 1 l/l/min, dolazi do povećanja produkcije željenog jedinjenja (Techapun i sar, 2003).

Slika 5.18. (c) prikazuje aktivnost produkovanih antagonističkih agenasa na četiri test fitopatogena izolata tokom 7 dana trajanja bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru sa brzinom mešanja 100 o/min i intenzitetom aeracije 1,5 l/l/min. Rezultati pokazuju da nakon 72 h kultivacije dolazi do intenzivnog porasta produkcije željenih agenasa. Kao i kod prethodne kultivacije, i ovde se maksimalna aktivnost na četiri test izolata registruje u 96 h kultivacije. Posmatrajući krive promene srednjih vrednosti prečnika zona inhibicije test izolata vrste *A. alternata* može se zaključiti da je njihov trend veoma sličan što je slučaj i kod test izolata vrste *F. avenaceum*. Međutim, izolati vrste *A. alternata* pokazuju značajno veću osetljivost na produkovane antagonističke agense pri čemu nastaju prečnici zona inhibicije rasta micelije *A. alternata* T1jg3 i KA10 od 78,67 mm i 78 mm, respektivno.

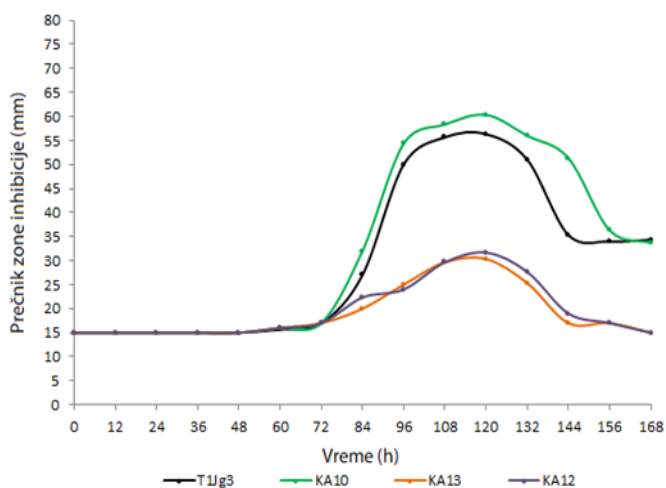
Na *F. avenaceum* KA12 i KA13 se u 96 h kultivacije formiraju prečnici zona inhibicije rasta micelije od 59,33mm i 56,67 mm, respektivno. Takođe, može se zaključiti da povećanjem protoka vazduha od 0,5 l/l min do 1,5 l/l/min pri istoj brzini mešanja od 100 o/min dolazi do značajnog povećanja produkcije željenih antagonističkih agenasa. Ovo je u skladu sa rezultatima Sousa i saradnici koji su ispitivali proizvodnju aktinomicina D primenom *S. parvulus* i takođe utvrdili da povećanje aeracije od 0,5 do 1,5 l/l/min značajno utice na povećanje količine produkovanog jedinjenja (Sousa i sar, 2002). S druge strane, Yen i Li (2014) su ispitivali uticaj aeracije na proizvodnju rapamicina primenom *S. hygrosopicus* i utvrdili su da upravo aeracija od 1,5 l/l/min daje najbolje prinose ovog jedinjenja (Yen i Li, 2014). Dakle, može se zaključiti da je intenzitet aeracije veoma bitan procesni parametar koji je u velikoj meri odgovoran za prenos kiseonika, rast i produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke u laboratorijskom bioreaktoru primenom *S. hygrosopicus*.

Na slici 5.19. (a) prikazane su srednje vrednosti prečnika zona inhibicije supernatanta kultivacione tečnosti na četiri test fitopatogena izolata tokom 7 dana kultivacije u bioreaktoru sa brzinom mešanja 200 o/min i intenzitetom aeracije 0,5 l/l/min. Rezultati pokazuju da vrlo rano dolazi do produkcije sekundarnih metabolita (već nakon drugog dana kultivacije) međutim, maksimalna antifungalna aktivnost na izolate *F. avenaceum* KA12 i KA13 uočava se u 108 h kultivacije pri čemu nastaju prečnici zona inhibicije od 27,67 mm i 26 mm, respektivno. Za razliku od *F. avenaceum* izolata, izolati vrste *A. alternata* i kod ovog bioprocesa pokazuju veću osetljivost na produkovane antagonističke agense a maksimalni prečnici zona inhibicije nastaju u 144 h kultivacije sa vrednostima od 50,67 mm za izolat KA10 i 44 mm za izolat T1jg3. Ovako primenjeni uslovi kultivacije u pogledu mešanja i aeracije očigledno imaju uticaj na metaboličke puteve proizvodnog mikroorganizma te dovode do produkcije antagonističkih agenasa različitom brzinom, što

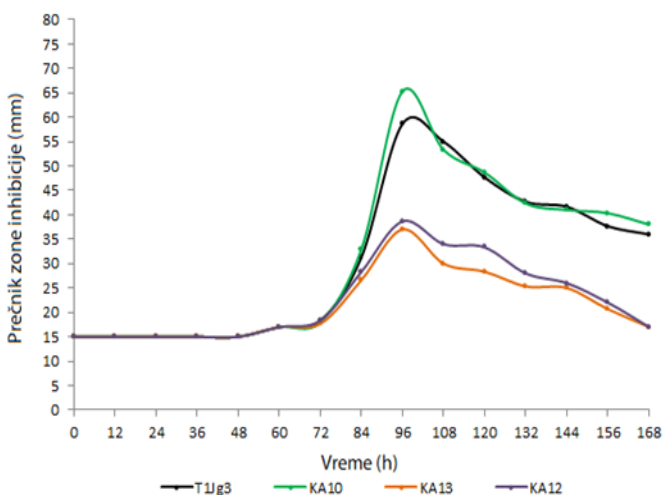
a)



b)



c)



Slika 5.19. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru sa mešanjem 200 o/min i intenzitetom aeracije:  
 a) 0,5 l/l/min b) 1 l/l/min c) 1,5 l/l/min

se ogleda u činjenici da različite vrste fitopatogenih gljiva ne pokazuju maksimalnu osetljivost u isto vreme. Ovi rezultati pokazuju da *S. hygroscopicus* verovatno proizvodi više od jednog (najmanje dva) antagonista. Ovakvi rezultati su se mogli očekivati s obzirom da su slični rezultati dobijeni i u poglavlju 5.6. pod istim procesnim uslovima u kojima se koristio isti proizvodni mikroorganizam na podlozi koja je kao izvor ugljenika sadržala glukozu a kao organski izvor azota, sojino brašno (Tadijan i sar, 2016).

Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus* u bioreaktoru sa mešanjem 200 o/min i intenzitetom aeracije 1 l/l/min, prikazana je na slici 5.19. (b). Rezultati pokazuju da se maksimalna proizvodnja antagonističkih agenasa uočava u 120 h kultivacije međutim, u skladu sa činjenicom da svi prečnici zona inhibicije veći od 22 mm označavaju da je primenjeni antifungalni antagonista potencijalno visoko efikasan (Shimizu i sar., 2009), možemo da

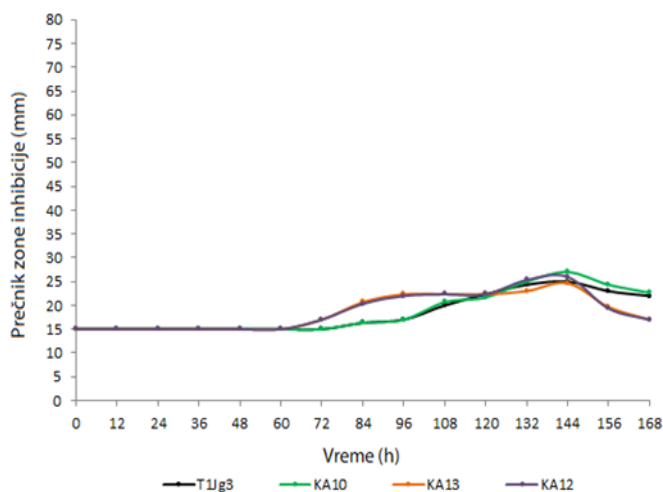
zaključimo da već nakon 84 h kultivacije nastaju prečnici zona sa visokom efikasnošću. *F. avenaceum* KA12 i KA13 pokazuju manju osetljivost sa prečnicima zona inhibicije 31,67 mm i 30,33 mm, respektivno, dok *A. alternata* KA10 i T1Jg3 pokazuju mnogo veću osetljivost sa prečnicima zona inhibicije rasta micelije od 60,33 mm i 56,33 mm, respektivno u 120 h kultivacije. Kao i kod bioprocesa sa brzinom mešanja 100 o/min, i kod ovih bioprocesa uočava se da sa povećanjem protoka vazduha dolazi do povećanja prečnika zona inhibicije.

Analizom rezultata proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke vrste *A. alternata* i *F. avenaceum* (slika 5.19. (c)) pokazuju da u uslovima kultivacije sa brzinom mešanja 200 o/min i intenzitetom aeracije 1,5 l/l/min dolazi do maksimalne produkcije željenih antagonističkih agenasa u 96 h kultivacije. Primenom ovih uslova kultivacije dobijaju se prečnici zona inhibicije od 65,33 mm i 58,67 mm za izolate *A. alternata* KA10 i T1Jg3, respektivno i 38,67 mm i 37 mm za izolate *F. avenaceum* KA12 i KA13, respektivno. Poređenjem rezultata dobijenih u bioprocima sa mešanjem 200 o/min može se zaključiti da sa povećanjem aeracije mikroorganizam ranije ulazi u stacionarnu fazu rasta u kojoj dolazi do maksimalne produkcije željenih antagonističkih agenasa što se prati preko povećanja prečnika zona inhibicije rasta micelije testiranih skladišnih patogena (Yen i Li, 2014).

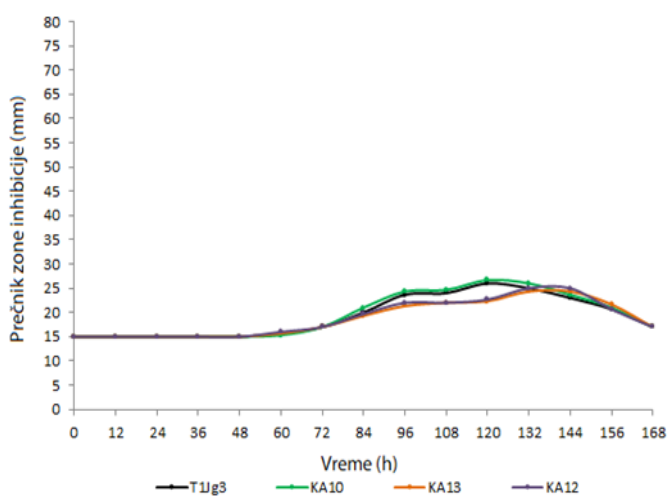
Ukoliko se uporede rezultati dobijeni u bioprocima u kojima je primenjena brzina mešanja od 100 i 200 o/min, može se zaključiti da u zavisnosti od primenjenog intenziteta aeracije dobijene maksimalne zone inhibicije su generalno veće kod bioprocesa sa mešanjem 100 o/min iako su i kod bioprocesa sa mešanjem 200 o/min izuzetno velike. S obzirom da je proizvodnja željenih metabolita u korelaciji sa morfologijom streptomiceta (Yen i Li, 2014) a poznato je da brzina mešanja može značajno da utiče na morfologiju mikroorganizama, možemo da pretpostavimo da manja brzina mešanja u ovom slučaju utiče pozitivno na željenu morfologiju proizvodnog mikroorganizma što rezultuje povećanju produktivnosti željenih antagonističkih agenasa efikasnih na test izolate vrste *A. alternata* i *F. avenaceum*.

Na slici 5.20. (a) prikazana je proizvodnja antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum* u laboratorijskom bioreaktoru pri brzini mešanja od 300 o/min i intenzitetom aeracije 0,5 l/l/min primenom *S. hygroscopicus*. Rezultati pokazuju da se maksimalne zone inhibicije rasta micelije sva četiri fitopatogena izolata formiraju u 144 h kultivacije. Zone koje se formiraju ne prelaze 27 mm za izolat *A. alternata* KA10 dok je najmanji prečnik zabeležen kod izolata *F. avenaceum* KA13 i iznosi 24,67 mm. S obzirom da se maksimalna produkcija javlja vrlo kasno a formirane zone su znatno manje u odnosu na zone formirane u bioreaktorima sa mešanjem 100 o/min i 200 o/min, može se zaključiti da uslovi primenjeni kod ovog bioprocesa ne odgovaraju u potpunosti proizvodnom mikroorganizmu *S. hygroscopicus*. Može se pretpostaviti da brzina mešanja 300 o/min nema pozitivan uticaj na produkciju usled osetljivosti proizvodnog mikroorganizma na sile smicanja koje se javljaju prilikom homogenizacije kultivacione tečnosti a koje mogu da

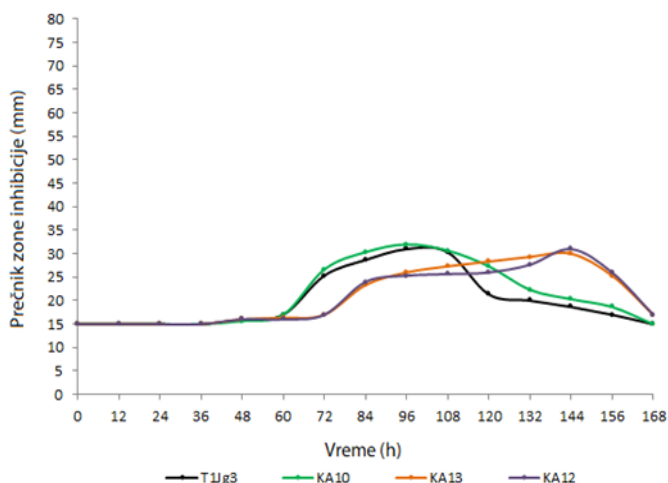
a)



b)



c)



Slika 5.20. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru sa mešanjem 300 o/min i intenzitetom aeracije:

a) 0,5 l/l/min b) 1 l/l/min c) 1,5 l/l/min

dovedu do promene u morfologiji i uticati na produktivnost ćelija proizvodnog mikroorganizma (Nigam i sar, 2012).

Proizvodnja antagonističkih agenasa u laboratorijskom bioreaktoru sa brzinom mešanja 300 o/min i intenzitetom aeracije 1 l/l/min primenom *S. hygroscopicus* prikazana je na slici 5.20. (b). Sa grafika se uočava da do maksimalne produkcije antagonističkih agenasa efikasnih na vrstu *A. alternata* dolazi nešto ranije u odnosu na produkciju agenasa efikasnih na vrstu *F. avenaceum*. Naime, maksimalni prečnici zona inhibicije na izolate *A. alternata* KA10 i T1Jg3 formiraju se u 120 h kultivacije i iznose 26,67 mm i 26 mm, respektivno. Za razliku od njih, izolati *F. avenaceum* KA12 i KA13 maksimalne prečnike zona inhibicije od 25 mm i 24,33 mm, respektivno, formiraju u 132 h kultivacije. Poređenjem sa prethodnim ogledom može se zaključiti da povećanje intenziteta aeracije utiče na skraćenje faze rasta i umnožavanja proizvodnog mikroorganizma. S druge



strane, skraćuje eksponencijalne faze rasta dovodi do produkcije manje količine biomase ćelija (slika 5.17).

Rezultati Sousa i saradnika (2002) pokazuju da povećanjem intenziteta aeracije od 0,5 do 1,5 l/l/min pri konstantnoj brzini mešanja 300 o/min, dolazi do povećanja produkcije aktinomicina D u laboratorijskom bioreaktoru primenom *S. parvulus* (Sousa i sar, 2002). Ovi rezultati poklapaju se sa rezultatima izvedenim u bioreaktoru sa brzinom mešanja 300 o/min i aeracijom 1,5 l/l/min primenom *S. hygroscopicus* (slika 5.20. (c)). Analizom svih bioprocasa rađenih u bioreaktoru sa brzinom mešanja 300 o/min može se zaključiti da bioproces sa intenzitetom aeracije 1,5 l/l/min daje najveće prečnike zona inhibicije na testirane izolate *A. alternata* KA10 i T1Jg3 i *F. avenaceum* KA12 i KA13, sa vrednostima od 32 mm, 31 mm, 31 mm i 30 mm, respektivno. Posmatrajući izmerene prečnike zona inhibicije može se zaključiti da su vrednosti za sva četiri izolata približno slične međutim, vreme u kome dolazi do produkcije željenih antagonističkih agenasa nije isto za obe vrste gljiva. Naime, maksimalna produkcija antagonista efikasnih na izolate vrste *A. alternata* javlja se u 96 h kultivacije. Ovo je značajno ranije u odnosu na prethodna dva eksperimenta sa protokom vazduha 0,5 l/l/min i 1 l/l/min, što nam još jednom pokazuje da veći intenzitet aeracije dovodi do bržeg ulaska proizvodnog mikroorganizma u stacionarnu fazu u kojoj dolazi do produkcije željenih antagonističkih agenasa (Sousa i sar, 2002). Međutim, posmatrajući trenutak u kome dolazi do maksimalne produkcije antagonista efikasnih na izolate vrste *F. avenaceum*, može se zaključiti da on nastupa u 144 h kultivacije. Sousa i saradnici su dobili slične rezultate prilikom proizvodnje aktinomicina D. Naime, pri istoj primenjenoj brzini mešanja i intenzitetu aeracije, maksimalna produkcija ovog jedinjenja registruje se u 144 h kultivacije *S. parvulus* (Sousa i sar, 2002).

Dakle, primena brzine mešanja od 300 o/min ima značajan uticaj na prinos antagonističkih agenasa skladišnih patogena jabuke primeno *S. hygroscopicus*. Uslovi sredine mogu da utiču na produkciju s obzirom da je biosinteza svakog aktivnog jedinjenja kodirana složenim genetskim klasterom koji obično sadrži i regulatorne i rezistentne gene. Takođe, ovi klasteri kontrolišu mnoštvo različitih regulatornih proteina, od kojih se neki nalaze samo u streptomicetama a utiču na produkciju različitih metabolita (Bibb, 2005).

Povećanje brzine mešanja od 0 do 300 o/min u laboratorijskom bioreaktoru značajno utiče na smanjenje produkcije ksilanaze primenom *Streptomyces* sp. Ab 106 (Techapun i sar, 2003). Ovi rezultati poklapaju se sa rezultatima dobijenim u istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije. Rezultati pokazuju da povećanje brzine mešanja do 300 o/min značajno utiče na smanjenje produkcije željenih antagonističkih agenasa. Takođe, morfologija streptomiceta utiče na njihovu produktivnost, te je utvrđeno da je za proizvodnju antibiotika primenom *S. lividans* najpoželjnija forma kompaktnih peleta, dok proizvodnja tilozina primenom *S. fradiae* zahteva formu veoma malih peleta (Yen i Li, 2014). Generalno se forma sitnijih peleta smatra najpogodnijim obikom za produkciju željenih metabolita primenom streptomiceta (Ilić i sar., 2014; Ilić i sar, 2008). Velike brzine mešanja

mogu da razore željene forme peleta i tako negativno utiču na produktivnost proizvodnog mikroorganizma (Shioya i sar, 1999).

S druge strane, povećanje intenziteta aeracije, bez obzira na primenjenu brzinu mešanja, dovodi do ranijeg ulaska mikroorganizma u stacionarnu fazu a samim tim ranije dolazi do maksimalne proizvodne željenih antifungalnih metabolita, antagonista skladišnih patogena jabuke. Yen i Li su u svojim istraživanjima došli do zaključka da povećanje intenziteta aeracije dovodi do ranije produkcije rapamicina primenom *S. hygroscopicus* (Yen i Li, 2014). To ujedno znači da se povećanjem aeracije skraćuje i eksponencijalna faza u kojoj dolazi do umnožavanja proizvodnog mikroorganizma, pa se samim tim smanjuje i sadržaj biomase ćelija proizvodnog mikroorganizma. Nigam i saradnici su tokom svojih istraživanja proizvodnje nitrilaze primenom *Streptomyces* sp. MTCC 7546 zaključili da se protok vazduha od 1 l/l/min i 1,5 l/l/min smatra optimalnim, intenzitet aeracije 0,7 l/l/min utiče na znatno manju produkciju a primenom 2 l/l/min praktično da i nema produkcije (Nigam i sar, 2012). Na osnovu dobijenih grafika može se zaključiti da se posmatrajući ispitivani opseg intenziteta aeracije, protok vazduha od 1,5 l/l/min pokazao kao najbolji za produkciju željenih antagonističkih agenasa dok se primenom intenziteta aeracije 0,5 l/l/min smanjuje prinos antifungalnih metabolita, antagonista skladišnih patogena jabuke. Dok velike brzine mešanja mogu da dovedu do rupture ćelije ili razaranja formi sitnih peleta, brzine mešanja niže od optimalne mogu dovesti do agregacije ćelija koja rezultira formiranju veoma velikih peleta, koje svakako nisu dobra forma za produkciju željenih metabolita (Mitrović i sar, 2017). Dakle, veoma je važno pronaći optimalne uslove u pogledu intenziteta aeracije i mešanja, kako bi dobili maksimalan prinos željenih aktivnih metabolita.

## 5.10. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA INTENZITETA AERACIJE I MEŠANJA U PODLOZI ZA PROIZVODNJU ANTAGONISTA SKLADIŠNIH PATOGENA JABUKE

U cilju dobijanja optimalnih vrednosti procesnih parametara važnih za sadržaj rastvorenog kiseonika u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, a sa ciljem dobijanja maksimalnog prinosa željenih antagonista aktivnih protiv skladišnih patogena jabuke iz rodova *Alternaria* i *Fusarium*, u okviru ove faze istraživanja odabrani su optimalna vrednost brzine mešanja i intenziteta aeracije.

Na osnovu prethodno dobijenih rezultata (poglavlje 5.9.1 i 5.9.2), u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* varirani su brzina mešanja (100-300 o/min), intenzitet aeracije (0,5-1,5 l/l/min) i vreme trajanja kultivacije u kome je uočena maksimalna produkcija željenih antagonističkih agenasa (96-144 h) u skladu sa primenjenim punim eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Svi eksperimenti u okviru ove faze istraživanja rađeni su u biorektoru zapremine 3 l, radne zapremine 2 l, pri čemu je temperatura održavana na 27°C.

Tabela 5.20. Vrednosti rezidualnog ugljenika, rezidualnog azota, suve materije, rezidualnog fosfata i prečnika zone inhibicije sva četiri test izolata u skladu sa eksperimentalnim planom

Redni broj	Rezidualni glicerol (g/l)	Rezidualni azot (g/l)	Suva mat. (g/l)	Rezidualni fosfati (g/l)	Prečnik zone inhibicije (mm)			
					<i>A.alternata</i>	<i>A.alternata</i>	<i>F.avenaceum</i>	<i>F.avenaceum</i>
					T1Jg3	KA10	KA13	KA12
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8
1	9,1	0,177	1,5206	0,499	45,67	36,67	41	39
2	4,92	0,098	1,8277	0,179	32,33	30,33	20,67	21,67
3	6,65	0,131	1,5462	0,291	50	54,33	25	24
4	6,40	0,123	1,5686	0,282	35,33	51,33	17	26,33
5	9,3	0,18	1,5204	0,504	61,33	51	46,33	48,67
6	4,32	0,07	2,1859	0,325	17	20,33	30	31
7	6,5	0,126	1,5679	0,284	56,33	60,33	30,33	31,67
8	4,56	0,058	2,2204	0,305	23	23,67	24,33	25
9	6,91	0,16	1,5543	0,498	46,67	51	36,67	38,33
10	7,04	0,129	1,5343	0,294	47,67	48,67	28,33	33,33
11	6,5	0,124	1,5749	0,285	54,67	55	29	29
12	7,6	0,134	1,5178	0,296	58,67	65,33	37	38,67
13	5,04	0,071	2,1370	0,344	23,67	24,33	21,33	22
14	6,99	0,127	1,5510	0,292	41,67	41	25	26
15	6,62	0,157	1,5559	0,484	41,33	44,33	31,33	32
16	6,87	0,164	1,6712	0,499	30,67	29,67	23	24,33
17	3,588	0,07	2,2250	0,346	25	27	24,67	26
18	4,95	0,072	2,1746	0,331	21,33	27,33	28,33	26
19	4,363	0,098	2,2028	0,369	17	17	22,33	22
20	6,4	0,124	1,5699	0,286	54	59,33	28	30,33
21	9,6	0,184	1,5023	0,5185	78,67	78	55,67	59,33
22	5,269	0,11	1,8077	0,192	25	29,33	25,33	27,33
23	6,77	0,159	1,6713	0,487	32,67	34,33	24	27,33
24	6,4	0,126	1,5679	0,289	55,33	59	26	29
25	4,85	0,09	1,8316	0,172	44	50,67	17	17
26	5,93	0,157	1,6713	0,486	26	26,67	17	17
27	4,067	0,074	2,2239	0,353	22,33	21,67	22,33	22,33
28	4,95	0,06	2,2193	0,309	26	26,67	22,33	22,67
29	4,99	0,075	2,0986	0,344	31	32	26	25,33
30	6,075	0,154	1,5562	0,476	39,33	39,33	20	21,67

Vrednosti variranih nezavisnih promenljivih (X1- brzina mešanja, X2- intenzitet aeracije i X3- vreme kultivacije) i njihovi odzivi, odnosno vrednosti zavisnih promenljivih, Y1- rezidualni glicerol, Y2 - rezidualni azot i Y3 - suva materija Y4 - rezidualni fosfati kao i vrednosti prečnika zona inhibicije rasta micelije test izolata Y5 - *A. alternata* T1Jg3, Y6 - *A. alternata* KA10, Y7 - *F. avenaceum* KA13 i Y8 - *F. avenaceum* KA12, prikazani su u tabeli 5.20.

Vrednost prečnika inhibicije rasta micelije testiranih skladišnih patogena (zavisne promenljive Y5-Y8) predstavljaju srednju vrednost prečnika inhibicije rasta micelije testiranog fitopatogenog izolata dobijenih iz tri ponavljanja.

Tabela 5.21. Analiza varijanse modelovanih odziva za biosintezu skladišnih patogena jabuke

Odziv	Rezidual		Model			F-vrednost	$p$ -vrednost	
	SS	Df	MS	SS	Df			MS
Y1	5,15	20	0,2575	1183,537	10	118,3537	459,6497	<0,0000001
Y2	0,00179	20	0,00009	0,469793	10	0,046979	524,4577	<0,0000001
Y3	0,05262	20	0,00263	97,28762	10	9,728762	3697,668	<0,0000001
Y4	0,02199	20	0,0011	4,052888	10	0,405289	368,462	<0,0000001
Y5	551,99	20	27,599	51428,12	10	5142,812	186,3373	<0,0000001
Y6	566,37	20	28,318	55800,9	10	5580,09	197,0484	<0,0000001
Y7	215,93	20	10,796	24651,41	10	2465,141	228,3296	<0,0000001
Y8	221,36	20	11,068	27001,88	10	2700,188	243,9582	<0,0000001

Analizom varijanse ispitana je adekvatnosti i značajnosti dobijenih matematičkih modela (tabela 5.21).  $p$ -vrednosti pokazuju da su modeli drugog reda svih modelovanih odziva statistički veoma značajni ( $p < 0,001$ ).

### 5.10.1. DEFINISANJE MATEMATIČKIH MODELA ZAVISNIH PROMENLJIVIH

Kako bi se definisale matematičke jednačine koje opisuju uticaj variranih parametara na odabrane pokazatelje uspešnosti bioprocesa, podaci iz tabele 5.20. fitovani su polinomom drugog reda. Procena statističke značajnosti svakog od koeficijenata regresione jednačine urađena je na osnovu  $p$ -vrednosti. Regresioni koeficijenti su značajni ukoliko je njihova  $p$ -vrednost manja od 0,05 i u tabeli su označeni oznakom \*. Svi ostali koeficijenti regresione jednačine nisu statistički značajni u intervalu poverenja 95%.

Kao što je pomenuto u poglavlju 5.8.1, vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) veće od 0,900 ukazuju na veoma dobro fitovanje rezultata polinomom drugog reda. Svakako, za bolje razumevanje interakcije variranih faktora na produkciju antagonista skladišnih patogena jabuke, regresione jednačine predstavljaju se grafički kao trodimenzionalne odzivne površine. Svaka odzivna površina prikazuje modelom predviđen uticaj dva faktora na posmatran odziv pri čemu treći faktor ima konstantnu vrednost. Odzivne površine koje opisuju uticaj dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora na svaki od gorenavedenih odziva (Y1-Y4) prikazane su u Prilogu 2.

Posmatrajući regresionu jednačinu za sadržaj rezidualnog glicerola može se zaključiti da je model adekvatan jer je njime objašnjeno 92% ukupnih varijacija posmatranog odziva. Tabela 5.22. pokazuje da je za posmatrani odziv statistički značajan jedino koeficijent interakcije brzine mešanja i intenziteta aeracije. U Prilogu 2, slika 8.4. (a) grafički je prikazana ova zavisnost u 96 h kultivacije. Rezultati pokazuju da predviđene vrednosti posmatranog odziva opadaju sa porastom intenziteta mešanja pri svim ispitivanim vrednostima intenziteta aeracije. Ovi rezultati su u dobroj korelaciji sa istraživanjima Yen i Hsiao koji su u

svom istraživanju zaključili da povećanje brzine mešanja dovodi do povećanja potrošnje glukoze iz podloge zbog čega na kraju bioprocesa zaostaje manje ovog šećera (Yen i Hsiao, 2013). Pri svim ispitivanim intenzitetima brzine mešanja, sa smanjenjem intenziteta aeracije sadržaj rezidualnog glicerola se smanjuje. Međutim, pri malim vrednostima iz ispitivanog opsega brzine mešanja, uticaj intenziteta aeracije na sadržaj rezidualnog glicerola je mnogo izraženiji nego pri većim brzinama mešanja. Na slici 8.4. (b) prikazan je uticaj brzine mešanja i vremena kultivacije na sadržaj rezidualnog glicerola pri konstantnom protoku vazduha od 1 l/min. Rezultati pokazuju da se minimalna količina rezidualnog glicerola postiže pri maksimalnoj vrednosti brzine mešanja dok je uticaj vremena kultivacije pri ovim uslovima vrlo slabo izražen. Pri srednjoj vrednosti brzine mešanja iz ispitivanog opsega, rezidualna količina glicerola se smanjuje sa smanjenjem intenziteta aeracije pri svim ispitivanim trajanjima kultivacije što je prikazano na slici 8.4. (c) u Prilogu 2.

Tabela 5.22. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za sadržaj rezidualnog glicerola, azota i fosfata i suve materije

Odzivi	Y1 – Rezidualni glicerol (g/l)		Y2 – Rezidualni azot (g/l)		Y3 – Suva materija (g/l)		Y4 – Rezidualni fosfati (g/l)	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
<i>Odsečak</i>								
$b_0$	3,860740	0,461461	0,21886*	< 0,0001*	2,52841*	< 0,0001*	0,92658*	< 0,0001*
<i>Linearni</i>								
$b_1$	0,006004	0,595319	-0,000147*	< 0,0001*	-0,008264*	< 0,0001*	-0,00671*	< 0,0001*
$b_2$	2,69828	0,239318	-0,009503*	< 0,0001*	-0,79900*	< 0,0001*	0,14238*	< 0,0001*
$b_3$	0,029052	0,729096	-0,000451*	< 0,0001*	0,000561*	< 0,0001*	0,000431*	< 0,0001*
<i>Kvadratni</i>								
$b_{11}$	-0,000029	0,143924	0,000001*	< 0,0001*	0,000025*	< 0,0001*	0,000015*	< 0,0001*
$b_{22}$	0,49375	0,531348	0,011321*	< 0,0001*	0,229774*	0,0082*	-0,039407*	< 0,0001*
$b_{33}$	-0,000194	0,570084	0,000001*	< 0,0001*	-0,000007*	< 0,0001*	-0,000003*	< 0,0001*
<i>Interakcije</i>								
$b_{12}$	-0,010313*	0,002151*	-0,000142*	< 0,0001*	0,000463*	< 0,0001*	-0,000196*	< 0,0001*
$b_{13}$	0,000012	0,844185	-0,000001*	< 0,0001*	0,000006*	< 0,0001*	-0,000009*	< 0,0001*
$b_{23}$	0,002458	0,842429	0,000247*	< 0,0001*	0,000642*	< 0,0001*	0,000095*	< 0,0001*
$R^2$	<b>0,92</b>		<b>0,96</b>		<b>0,98</b>		<b>0,93</b>	

U pogledu statističke značajnosti koeficijenata regresione jednačine za sadržaj rezidualnog azota, iz tabele 5.22. može se uočiti da su značajni svi koeficijenti regresione jednačine kojom nije objašnjeno svega 4% ukupnih varijacija. U Prilogu 2 nalaze se trodimenzionalne odzivne površine koje slikovito predstavljaju uticaj dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg. Rezultati pokazuju da brzina mešanja ima značajniji uticaj na posmatrani odziv u odnosu na intenzitet aeracije i vreme kultivacije u ispitivanim opsezima i da se sadržaj rezidualnog azota smanjuje sa povećanjem intenziteta aeracije što je u korelaciji sa objavljenim literaturnim podacima (Mitrović i sar, 2017).

$p$ -vrednost kod regresione jednačine za sadržaj suve materije pokazuju da su statistički značajni svi linearni, svi kvadratni koeficijenti i svi koeficijenti koji opisuju međusobne interakcije nezavisnih promenljivih. Negativan uticaj na posmatrani odziv pokazuju linearni koeficijenti brzine mešanja i intenziteta aeracije kao i kvadratni koeficijent vremena kultivacije. Vrednost koeficijenta determinacije pokazuje da se rezultati sadržaja suve materije veoma dobro fituju polinomom drugog reda pri čemu samo 2% varijacija posmatranog odziva nije moguće objasniti modelom. U Prilogu 2 prikazane su odzivne površine koje slikovito prikazuju uticaj dve interakcije pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora na posmatrani odziv. Slika 8.6. (a) ilustruje uticaj interakcije brzine mešanja i intenziteta aeracije na sadržaj suve materije u 96 h kultivacije. Rezultati pokazuju da je rast i razmnožavanje ćelija biokatalizatora najizraženiji pri velikim brzinama mešanja. Ovi rezultati poklapaju se sa rezultatima potrošnje svih nutrijenata u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus*. Naime, sa porastom brzine mešanja od 100 o/min do 300 o/min dolazi do postepenog porasta potrošnje osnovnih nutrijenata bioprocasa. S obzirom da se nutrijenti najviše koriste za rast i razmnožavanje proizvodnog mikroorganizma, logično je da će povećanjem brzine mešanja doći i do povećanja sadržaja suve materije. Mnogi naučnici su kroz svoja istraživanja dali potvrdu ovom zaključku (Yen i Hsiao; 2013; Nigam i sar, 2012; Gottschalk i sar, 2003; Mitrović i sar, 2017; Feng i sar, 2002). Značaj uticaja brzine mešanja na posmatrani odziv potvrđuju i rezultati prikazani na slici 8.6. (b). U slučaju odzivne površine koja opisuje uticaj interakcije intenziteta aeracije i vremena kultivacije pri mešanju 200 o/min (slika 8.6.c), može se uočiti da se veće vrednosti suve materije postižu pri manjim protocima vazduha što je u skladu sa činjenicom da smanjenjem protoka vazduha dolazi do veće potrošnje nutrijenata iz podloge za kultivaciju *S. hygrosopicus*.

Koeficijent determinacije za regresionu jednačinu sadržaja rezidualnog fosfata pokazuje da je čak 93% varijacija objašnjeno definisanim matematičkim modelom. Posmatrajući  $p$ -vrednosti koeficijenata regresione jednačine za sadržaj rezidualnog fosfata (tabela 5.22.) može se uočiti da su statistički značajni svi koeficijenti regresione jednačine. Na slici 8.7. (a) iz Priloga 2, prikazana je predikcija sadržaja rezidualnog fosfata u kultivacionoj tečnosti pri različitim vrednostima brzine mešanja i intenziteta aeracije u 96 h kultivacije. Grafički prikazani rezultati pokazuju da pri konstantnom intenzitetu aeracije promena brzine mešanja ima značajan uticaj na posmatrani odziv. Kao što je slučaj i kod prethodna dva nutrijenta, najveća potrošnja fosfata registruje se kod većih brzina mešanja odnosno, sadržaj rezidualnih fosfata je minimalan pri vrednostima brzine mešanja u opsegu 220-240 o/min što je potvrđeno u objavljenoj literaturi (Mitrović i sar., 2017). Značaj brzine mešanja na sadržaj rezidualnog fosfata slikovito je prikazan i na slici 8.7. (b) koja opisuje uticaj interakcije brzine mešanja i vremena kultivacije pri protoku vazduha 1 l/l/min. Uticaj interakcije intenziteta aeracije i vremena kultivacije pri konstantnoj brzini mešanja 200 o/min prikazan je na slici 8.7. (c). Rezultati pokazuju da se najniže vrednosti rezidualnih fosfata postižu pri najmanjem intenzitetu aeracije iz ispitivanog opsega.

Tabela 5.23. Koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za prečnike zona inhibicije na testirane izolate

Odzivi	Y5 - Prečnik zone inhibicije KA10 ( <i>A. alternata</i> )		Y6 - Prečnik zone inhibicije T1Jg3 ( <i>A. alternata</i> )		Y7 - Prečnik zone inhibicije KA12 ( <i>F. avenaceum</i> )		Y8 - Prečnik zone inhibicije KA13 ( <i>F. avenaceum</i> )	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
<i>Odsečak</i>								
$b_0$	-94,47509	0,095070	-133,8518*	0,020584*	22,90454	0,504632	19,67593	0,561147
<i>Linearni</i>								
$b_1$	0,39527*	0,002919*	0,33917*	0,008006*	-0,23630*	0,004102*	-0,24380*	0,002944*
$b_2$	171,0168*	< 0,0001*	144,1667*	< 0,0001*	31,59093*	0,042586*	24,20370	0,108488
$b_3$	0,57090	0,517958	1,48071	0,099208	0,29833	0,588339	0,38638	0,479026
<i>Kvadratni</i>								
$b_{11}$	-0,00153*	< 0,0001*	-0,00114*	< 0,0001*	0,000155	0,2370	0,00029*	0,0326*
$b_{22}$	-23,88806*	0,0081*	-12,6667	0,1302	7,75083	0,1429	9,75000	0,0663
$b_{33}$	-0,00149	0,6764	-0,0054	0,1366	-0,003002	0,1887	-0,00319	0,1580
<i>Interakcije</i>								
$b_{12}$	-0,10167*	0,0035*	-0,15222*	< 0,0001*	-0,11056*	< 0,0001*	-0,10667*	< 0,0001*
$b_{13}$	0,00186*	0,0086*	0,00133*	0,0480*	0,00198*	< 0,0001*	0,00162*	0,0006*
$b_{23}$	-0,73380*	< 0,0001*	-0,59954*	0,00012*	-0,094907	0,2496	-0,074074	0,3599
$R^2$	0,92		0,92		0,90		0,90	

Dakle, analizirajući prethodne rezultate može se zaključiti da povećanje brzine mešanja doprinosi povećanju potrošnje osnovna tri nutrijenta bioprocesa. Istovremeno sa povećanjem njihove potrošnje raste i količina biomase ćelija proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus*, što zaključujemo indirektno na osnovu sadržaja suve materije. S druge strane, posmatrajući uticaj intenziteta aeracije, uočava se da najveći sadržaj suve materije nastaje primenom najmanjih protoka vazduha iz ispitivanog opsega. Porast intenziteta aeracije rezultuje smanjenju potrošnje nutrijenata a samim tim i nastanku manje količine biomase ćelija biokatalizatora.

U tabeli 5.23. prikazani su koeficijenti regresionih jednačina, njihova značajnost i koeficijent determinacije za prečnike zona inhibicije rasta micelije ispitivanih skladišnih patogeni *A. alternata* T1Jg3 i KA10 i *F. avenaceum* KA12 i KA13.

Regresiona jednačina za prečnik zone inhibicije rasta micelija izolata *A. alternata* KA10 pokazuje da su koeficijenti koji pokazuju statističku značajnost slični kao i kod izolata *A. alternaria* T1Jg3 (tabela 5.23). Jedina razlika je kvadratni koeficijent intenziteta aeracije koji je samo kod izolata KA10 statistički značajan, a prisustvo negativnog predznaka pokazuje da je njegov uticaj na posmatran odziv negativan. Takođe, može se uočiti da značajan uticaj na prečnike zona inhibicije rasta micelije oba *A. alternata* izolata pokazuje član međusobne interakcije brzine mešanja i intenziteta aeracije što još jednom potvrđuje značaj uticaja ova dva procesna parametra na produkciju željenih antagonističkih agenasa (Gottschalk i sar, 2003; Techapun i sar, 2003; Feng i sar, 2002). Ova sličnost dobijena kod izolata vrste *A. alternata* je očekivana s obzirom da su prethodni rezultati (poglavlje 5.9.2) pokazali da je

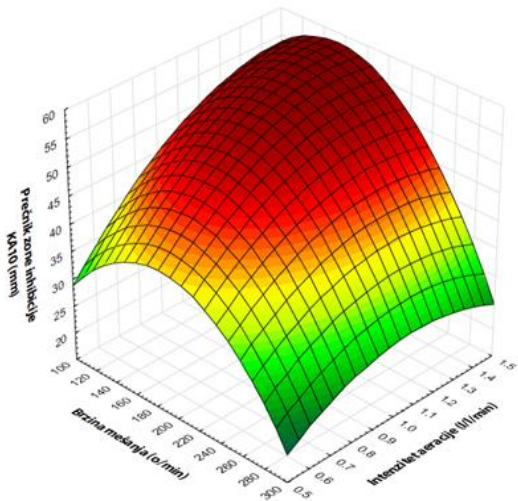
njihova osetljivoist na produkovane antagoniste vrlo slična (u nekim slučajevima i ista) te se može pretpostaviti da su oba izolata osetljiva na iste produkovane aktivne komponente. Mnogi naučnici su kroz svoja istraživanja došli do zaključka da jedna vrsta streptomicete može da produkuje antagoniste aktivne protiv različitih izolata pa čak i vrsta roda *Alternaria*, što je slučaj i u ovom istraživanju (Al-Askar i sar., 2011; Khamna i sar., 2009). Koeficijenti determinacije za oba ispitivana izolata pokazuju da je 92% svih varijacija objašnjeno modelom što ukazuje da su rezultati dobro fitovani polinomom drugog reda. Na slikama 5.21. i 5.22. prikazani su uticaji dva faktora na prečnik zone inhibicije rasta micelije dva izolata vrste *A. alternata* pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora.

Uticaj interakcije brzine mešanja i intenziteta aeracije na inhibiciju rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 u 120 h kultivacije prikazan je na slici 5.21. (a). Rezultati prikazani na odzivnoj površini pokazuju da u 120 h kultivacije veliki opseg brzina mešanja i intenziteta aeracije ima pozitivan uticaj na posmatrani odziv. Pojedini naučnici su u svojim istraživanjima došli do zaključka da se upravo u ovom satu kultivacije produkuje najveća količina aktivnog jedinjenja primenom streptomiceta (Yen i Hsiao; Techapun i sar, 2003). Svakako, najveća produkcija pomenutih metabolita registruje se kod nižih brzina mešanja i pri najvećem intenzitetu aeracije iz ispitivanog opsega. Yen i Li su takođe potvrdili da najveća količina aktivnog jedinjenja nastaje primenom intenziteta aeracije 1,5 l/l/min (Yen i Li, 2014) što je potvrda ovom istraživanju.

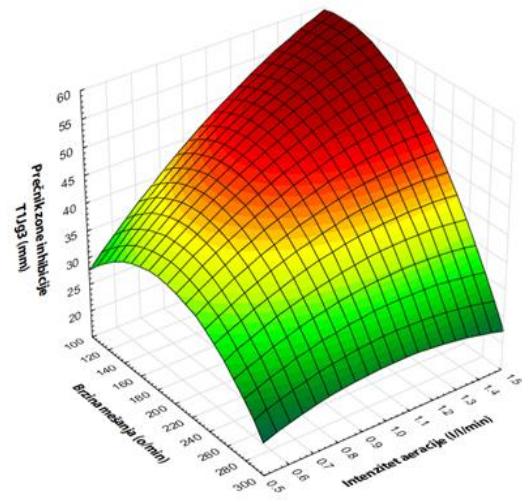
Na slici 5.21. (b) prikazan je uticaj vremena kultivacije i brzine mešanja na prečnik zone inhibicije rasta micelije test izolata *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti intenziteta aeracija (1 l/l/min). Odzivna površina pokazuje da najmanji prečnici zona inhibicije rasta test izolata nastaju kada se primene velike brzine mešanja iz ispitivanog opsega. Techapun i saradnici su tokom svog istraživanja došli do zaključka da povećanje brzine mešanja iznad 250 o/min dovodi do razaranja ćelija streptomiceta pri čemu one postaju neproduktivne (Techapun i sar, 2003). Postepenim smanjenjem brzine mešanja dolazi do porasta produkcije antifungalnih metabolita sve do brzine od oko 150 o/min kada se u 96 h kultivacije uočava maksimalna produkcija. Do kraja kultivacije količina produkovanih antagonističkih agenasa se postepeno smanjuje.

Odzivna površina prikazana na slici 5.21. (c) prikazuje predikciju uticaja vremena kultivacije i intenziteta aeracije na produkciju antagonističkih agenasa efikasnih na test izolat *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti brzine mešanja (200 o/min). Ova interakcija pokazuje veoma značajan uticaj na posmatrani odziv u regresionoj jednačini prikazanoj u tabeli 5.23. Maksimalna produkcija antifungalnih metabolita uočava se u 96 h kultivacije pri maksimalnom protoku vazduha iz ispitivanog opsega, 1,5 l/l/min. Sousa i saradnici su takođe ispitivali uticaj aeracije na produkciju aktivnih metabolita streptomiceta i došli su do istih zaključaka da porastom intenziteta aeracije od 0,5 l/l/ min do 1,5 l/l/min raste i produktivnost bez obzira na primenjenu brzinu mešanja (Sousa i sar, 2002).

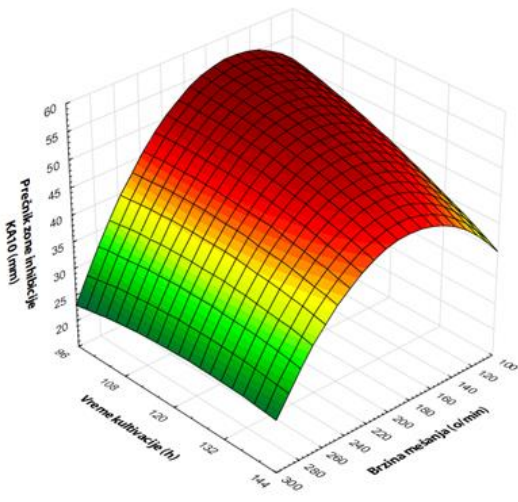




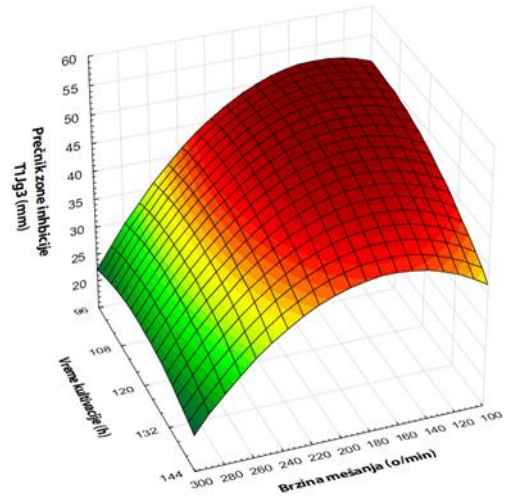
a)



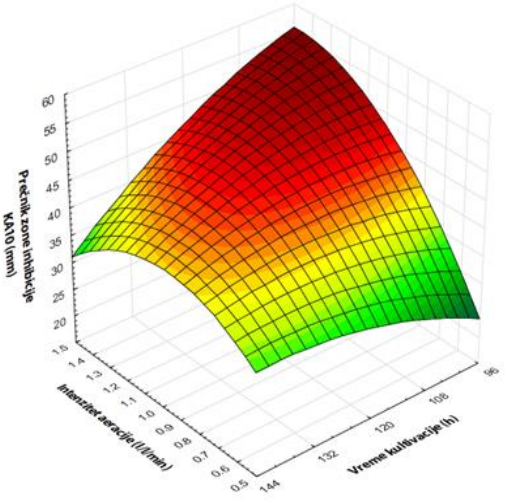
a)



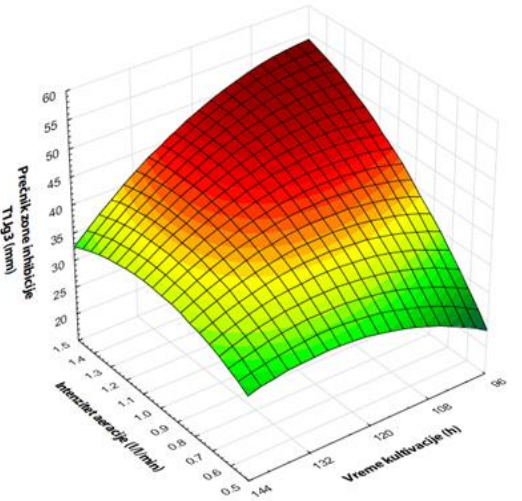
b)



b)



c)



c)

Slika 5.21. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* KA10 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

- a) vreme kultivacije
- b) intenzitet aeracije
- c) brzina mešanja

Slika 5.22. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *A. alternata* T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

- a) vreme kultivacije
- b) intenzitet aeracije
- c) brzina mešanja

Posmatrajući odzivne površine za oba izolata vrste *A. alternata* (slike 5.21. i 5.22.) može se primetiti njihova velika sličnost što nije čudno s obzirom da oba izolata pokazuju gotovo istu osetljivosti na antagonističke agense produkovane kultivacijom *S. hygroscopicus*. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Aghighi i saradnika koji su ispitivali delovanje streptomiceta na različite vrste roda *Alternaria* i ustanovili su da *Alternaria* vrste pokazuju sličnu osetljivost na produkovane aktivne agense (Aghighi i sar., 2004). Slika 5.22. (a) predstavlja uticaj brzine mešanja i intenziteta aeracije na posmatrani odziv pri konstantnoj vrednosti vremena kultivacije (120 h). S obzirom da koeficijent koji opisuje ovu interakciju ima negativan predznak, ova interakcija negativno utiče na posmatrani odziv. Sa prikazane odzivne površine jasno se uočava da do porasta prečnika zone inhibicije dolazi povećanjem protoka vazduha i istovremeno smanjenjem brzine mešanja kultivacione tečnosti. Svakako, širok opseg primenjenih brzina mešanja (100–250 o/min) doprinosi dobroj produkciji željenih antifungalnih metabolita što se poklapa sa istraživanjima Techapun i saradnika (Techapun i sar, 2003). Međutim, uočava se da najveći prečnik zone inhibicije rasta micelije fitopatogenog izolata *A. alternata* T1Jg3 nastaje kada se primeni najveći intenzitet aeracije i najmanja brzina mešanja iz ispitivanog opsega. Povećanjem brzine mešanja smanjuje se produktivnost što se može povezati sa činjenicom da veće brzine mešanja utiču na razaranje formi peleta i time negativno utiču na produkciju željenih antagonističkih agenasa (Shioya i sar, 1999).

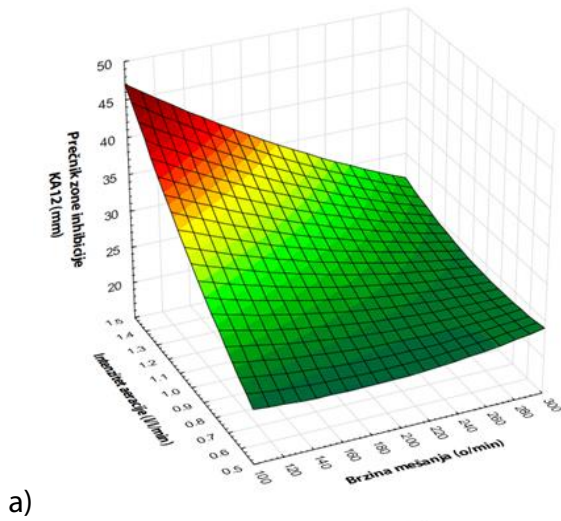
Prikaz predikcije efikasnosti produkovanih antagonističkih agenasa na testirani izolat *A. alternata* T1Jg3 koji nastaje variranjem brzine mešanja i vremena kultivacije pri konstantnoj vrednosti intenziteta aeracije (1 l/l/min) prikazan je na slici 5.22. (b). U širokom opsegu primenjenih brzina mešanja može se uočiti veoma dobra produkcija željenih agenasa. Međutim, povećanje brzine mešanja od 250 o/min do 300 o/min značajno smanjuje količinu produkovanih antifungalnih metabolita efikasni na ispitivani fitopatogeni izolat, što su u svom istraživanju uočili i Techapun i saradnici (Techapun i sar, 2003). S druge strane, odzivna površina pokazuje da u celom ispitivanom opsegu vremena kultivacije uočava se dobra produkcija sekundarnih antifungalnih metabolita efikasni na izolat *A. alternata* T1Jg3. Ovaj rezultat poklapa se sa rezultatima Yen i Hsiao koji su uočili najveću produktivnost testirane streptomicete upravo između 96 h i 144 h kultivacije (Yen i Hsiao, 2013).

Slika 5.22. (c) opisuje uticaj intenziteta aeracije i vremena kultivacije na prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 pri konstantnoj vrednosti brzine mešanja (200 o/min). Maksimalna produkcija antifungalnih metabolita efikasni na ispitivani test izolat postiže se u 96 h kultivacije primenom intenziteta aeracije 1,5 l/l/min. Smanjenjem intenziteta aeracije smanjuje se i prinos željenih antifungalnih metabolita pri čemu kod primene intenziteta aeracije 0,5 l/l/min produkcija antifungalnih metabolita nije zadovoljavajuća. Ovi rezultati poklapaju se sa rezultatima Yin i saradnika koji su zaključili da veće količine rastvorenog kiseonika u podlozi rezultuju formiranju produktivnih formi peleta čime se postiže veća produkcija željenih antagonističkih agenasa primenom *S. hygroscopicus* (Yin i sar., 2008).

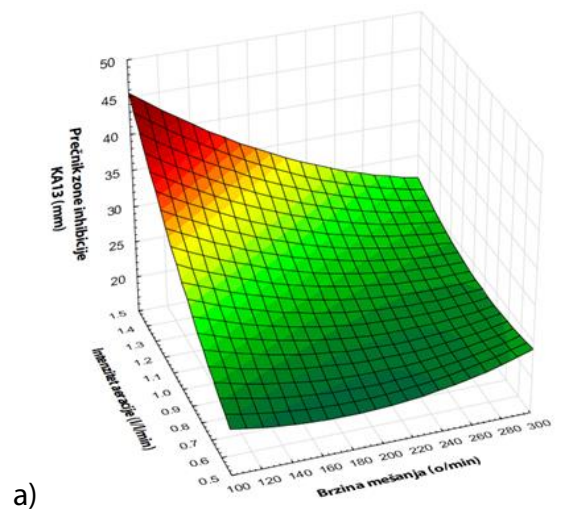
Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije dva izolata vrste *F. avenaceum* pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora prikazan je na odzivnim površinama na slikama 5.23. i 5.24. Regresione jednačine za prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 i KA13 prikazani su u tabeli 5.23. Dobijene *p*-vrednosti pokazuju da su za oba ispitivana izolata statistički značajni linearni koeficijenti brzine mešanja i interakcije između brzine mešanja i intenziteta aeracije i brzine mešanja i vremena kultivacije. S obzirom da linearni koeficijent brzine mešanja ima negativan predznak, to ukazuje da povećanje brzine mešanja kultivacione tečnosti rezultuje smanjenju vrednosti posmatranog odziva odnosno dobijenih prečnika zona inhibicije rasta micelije testiranih izolata. Pošto su oba izolata ovog roda pokazala vrlo sličnu osetljivost na antagonističke agense produkovane primenom *S. hygroscopicus*, može se pretpostaviti da isti agensi pokazuju delovanje na oba ispitivana izolata roda *Fusarium*. Al-Askar i saradnici su takođe potvrdili da pojedine streptomicete pokazuju delovanje na iste ili različite *Fusarium* vrste (Al-Askar i sar). Koeficijenti determinacije za oba odziva imaju vrednost 0,90, te se može zaključiti da su rezultati prečnika inhibicije rasta micelije oba *Fusarium* izolata dobro fitovani polinomom drugog reda.

Na slici 5.23. (a) prikazan je uticaj interakcije brzine mešanja i intenziteta aeracije na prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 u 96 h kultivacije. Sa odzivne površine se može uočiti da u širokom opsegu primenjenih brzina mešanja i protoka vazduha, produkcija željenih antagonističkih agenasa nije zadovoljavajuća. Rezultati prikazani na odzivnoj površini pokazuju da je za maksimalnu produkciju antifungalnih metabolita najbolje primeniti najmanju brzinu mešanja i najveći intenzitet aeracije iz ispitivanog opsega. Da je za produkciju aktivnih komponenti primenom streptomiceta najpogodniji intenzitet aeracije 1,5 l/l/min, potvrdili su i drugi naučnici (Yen i Li, 2014; Gottschalk i sar, 2003). Smanjenjem intenziteta aeracije do 0,5 l/l/min kao i povećanje brzine mešanja do 300 o/min dovodi do smanjenja produkcije željenih antagonističkih agenasa. Dakle, veća produkcija željenih aktivnih agenasa postiže se pri manjim brzinama mešanja što su potvrdili i Yen i Hsiao u svom istraživanju (Yen i Hsiao, 2013). Interakcija ova dva procesna parametra pokazuje statističku značajnost (tabela 5.23.), što nije čudno obzirom da oba parametra utiču na količinu prisutnog kiseonika u podlozi a istovremeno i na morfologiju samih ćelija proizvodnog mikroorganizma (Shioya i sar, 1999; Yin i sar., 2008).

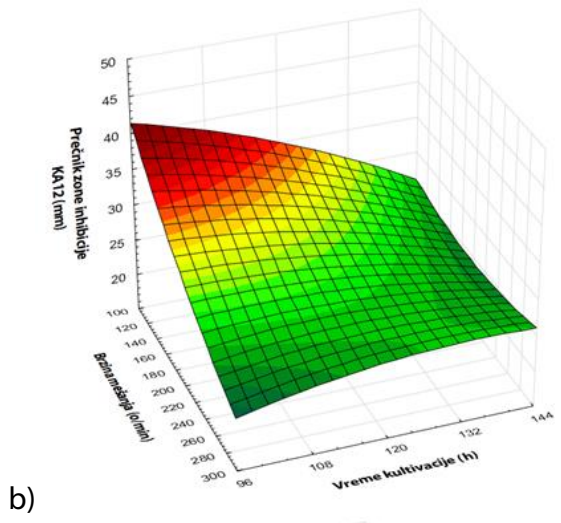
Uticaj brzine mešanja i vremena kultivacije na prečnik zone inhibicije rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 pri konstantnom intenzitetu aeracije 1 l/l/min, prikazan je na slici 5.23. (b). Rezultati pokazuju da željeni prečnici zona inhibicije nastaju od 96 h do 120 h kultivacije primenom manjih brzina mešanja, pri čemu u 96 h kultivacije pokazuju svoju najveću vrednost. Od 120 h pa do kraja bioprocesa produkcija antifungalnih metabolita se značajno smanjuje (Mitrović i sar., 2017). S druge strane, produkcija željenih antagonističkih agenasa ostvaruje se u opsegu brzina mešanja od 100 o/min do 150 o/min. Dalje povećanje brzine mešanja negativno utiče na produkciju pomenutih agenasa što još jednom potvrđuje značaj uticaja mešanja na produkciju (Yen i Hsiao, 2013).



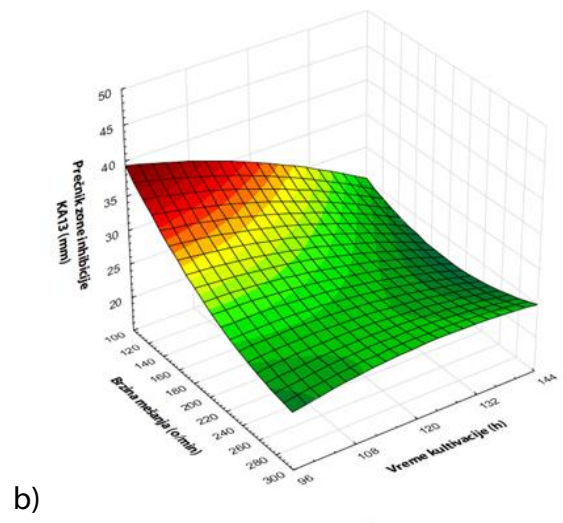
a)



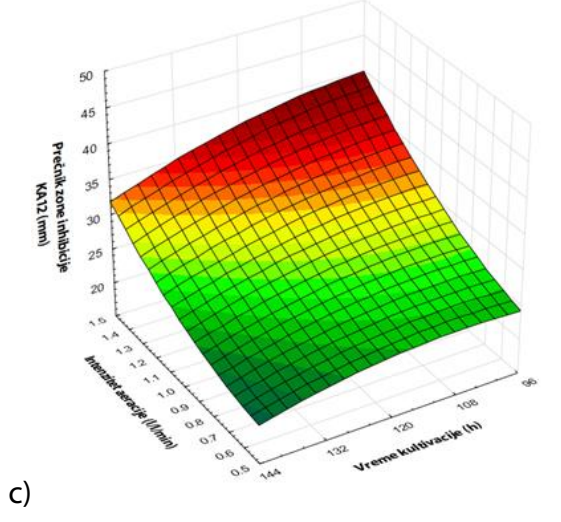
a)



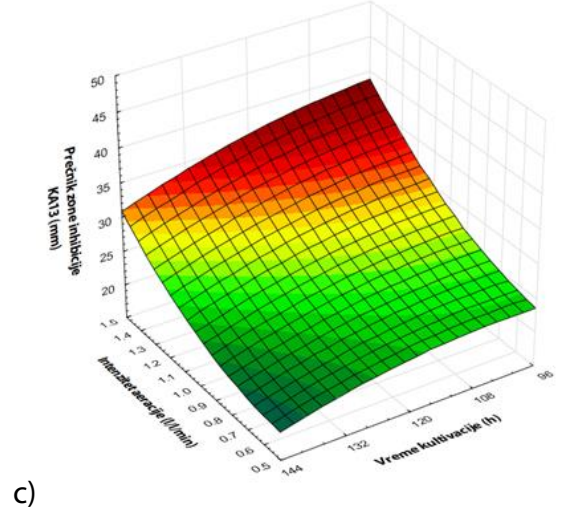
b)



b)



c)



c)

Slika 5.23. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
 a) vreme kultivacije  
 b) intenzitet aeracije  
 c) brzina mešanja

Slika 5.24. Uticaj interakcije dva faktora na inhibiciju rasta micelije gljive *F. avenaceum* KA13 pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
 a) vreme kultivacije  
 b) intenzitet aeracije  
 c) brzina mešanja

Slika 5.23. (c) grafički prikazuje uticaj intenziteta aeracije i vremena kultivacije na produkciju antifungalnih metabolita efikasnih na fitopatogeni izolat *F. avenaceum* KA12 pri konstantnoj brzini mešanja 200 o/min. Najveća produkcija željenih antagonističkih agenasa uočava se kod protoka vazduha od 1,5 l/l/min u 96 h kultivacije pri čemu smanjenje intenziteta aeracije ispod ove vrednosti dovodi do postepenog smanjenja produkcije antifungalnih metabolita, što se ogleda i u smanjenju prečnika zone inhibicije rasta micelije ispitivanog test izolata.

Za bolje razumevanje interakcija variranih faktora na prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13, regresiona jednačina prikazana je u obliku odzivnih površina na slici 5.24. Slika 5.24. (a) opisuje uticaj intenziteta aeracije i brzine mešanja na posmatrani odziv pri konstantnoj vrednosti vremena kultivacije (120h). Sa prikazane odzivne površine može se uočiti da se najveća produkcija antagonističkih agenasa efikasnih na ispitivani izolat primenom *S. hygroscopicus* uočava primenom protoka vazduha od 1,5 l/l/min i brzine mešanja 100 o/min. Svako smanjenje jednog od ova dva parametra dovodi do smanjenja produkcije željenih agenasa što se ogleda u smanjenju prečnika zone inhibicije rasta micelije test izolata *F. avenaceum* KA13. Slika 5.24. (b) prikazuje predikciju uticaja brzine mešanja i vremena kultivacije na prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13. Rezultati pokazuju da se najveće zone formiraju u 96 h kultivacije pri brzini mešanja 100 o/min ukoliko se intenzitet aeracije održava konstantnim, 1 l/l/min. Kako kultivacija dalje odmiče, količina produkovanih antifungalnih metabolita efikasnih na ispitivani fitopatogeni izolat se smanjuje. Takođe, povećanje brzine mešanja utiče na smanjenje prečnika zone inhibicije rasta micelije testiranog izolata.

Uticaj intenziteta aeracije i vremena kultivacije na posmatrani odziv pri konstantnoj brzini mešanja (200 o/min) prikazana je na slici 5.24. (c). Rezultati prikazani na odzivnoj površini pokazuju da najveća produkcije antifungalnih metabolita odnosno, najveći prečnik zone inhibicije rasta micelije testiranog izolata nastaje u 96 h kultivacije kada se primeni najveća vrednost intenziteta aeracije iz ispitivanog opsega, 1,5 l/l/min. Primenom ovog intenziteta aeracije, produkcija željenih antagonističkih agenasa je zadovoljavajuća u svim analiziranim vremenima trajanja bioprocasa. Smanjenjem intenziteta aeracije ispod 1,5 l/l/min dolazi do postepenog smanjenja produkcije željenih agenasa. Da smanjenje intenziteta aeracije utiče na produkciju željenih aktivnih agenasa potvrdili su i Sousa i saradnici u svom istraživanju sa streptomicetama (Sousa i sar, 2002).

### 5.10.2. OPTIMIZACIJA PARAMETARA BIOPROCESA

S obzirom da je osnovni cilj biotehnološke proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum* dobijanje maksimalnih količina pomenutih antagonističkih agenasa, uslovi optimizacije definisani su upravo sa ciljem maksimizacije prečnika zone inhibicije pomenutih vrsta fitopatogenih gljiva. Prethodno je ustanovljeno

da *S. hygroscopicus* verovatno produkuje više od jedne aktivne komponente jer se aktivnost supernatanta kultivacione tečnosti razlikuje u zavisnosti od vremenskog interval koji je prošao od početka kultivacije. Na osnovu iznetih činjenica definisani su uslovi optimizacije koja je izvedena u tri seta.

U prvom setu optimizacije cilj je bio da se definišu vrednosti parametara važnih za rastvorljivost kiseonika u kultivacionoj tečnosti kao i vremena kultivacije *S. hygroscopicus* sa ciljem proizvodnje maksimalne količine antagonističkih agenasa efikasnih samo na izolate vrste *A. alternata*, dok su vrednosti ostalih zavisnih i nezavisnih promenljivih definisane u opsegu.

Tabela 5.24. Prvi set optimizacije: uslovi i dobijene optimalne vrednosti

Nezavisne promenljive		vrednosti
Brzina mešanja (o/min)	u opsegu	186,45
Intenzitet aeracije (l/l/min)	u opsegu	1,5
Vreme kultivacije (h)	u opsegu	96
Zavisne promenljive		Predviđene vrednosti
Rezidualni glicerol (g/l)	u opsegu	7,7998
Rezidualni azot (g/l)	u opsegu	0,1385
Rezidualni fosfati (g/l)	u opsegu	0,2966
Suva materija (g/l)	u opsegu	1,5023
<i>A. alternata</i> KA10 (mm)	maksimalan	69,08
<i>A. alternata</i> T1Jg3 (mm)	maksimalan	64,83
<i>F. avenaceum</i> KA12 (mm)	u opsegu	40,87
<i>F. avenaceum</i> KA13 (mm)	u opsegu	38,63
<b>Ukupna željena funkcija</b>		<b>0,814</b>

Rezultati prvog seta optimizacije (tabela 5.24.) pokazuju da su optimalni uslovi za maksimalnu produkciju antifungalnih metabolita, antagonista vrste *A. alternata* pri kojima ukupna željena funkcija ima najveću vrednost 0,814: brzina mešanja 186,45 o/min, intenzitet aeracije 1,5 l/l/min i vreme kultivacije 96 h. Za izvođenje bioprocasa pri ovako definisanim optimalnim uslovima, modelima su predviđene sledeće vrednosti posmatranih odziva: sadržaj rezidualnog ugljenika, 7,7998 g/l; sadržaj rezidualnog azota, 0,1385 g/l; sadržaj suve materije 1,5023 g/l; sadržaj rezidualnih fosfata 0,2966 g/l; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3, 64,83 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10, 69,08 mm. Ovi rezultati ukazuju da bi se u slučaju vođenja bioprocasa isključivo za dobijanje antifungalnih metabolita, antagonista vrste *A. alternata* pri maksimalnom intenzitetu aeracije i brzini mešanja bliskoj srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega dužina trajanja kultivacije mogla skratiti na 96 h.

Cilj drugog seta optimizacije bio je da se definišu optimalne vrednosti brzine mešanja, intenziteta aeracije i vremena kultivacije *S. hygroscopicus* sa ciljem maksimizacije proizvodnje antagonističkih agenasa efikasnih samo na izolate vrste *F. avenaceum*, kada se sve promenljive i svi drugi odzivi definišu u okvirima ispitivanih opsega.

Rezultati drugog seta optimizacije (tabela 5.25.) pokazuju da je maksimalna vrednost ukupne željene funkcije 0,674 pri čemu optimalne vrednosti ispitivanih faktora imaju vrednosti: brzina mešanja 100 o/min; intenzitet aeracije 1,2 l/l/min i vreme kultivacije 96 h. Primenom ovih, modelom predviđenih vrednosti, dobijaju se sledeće vrednosti posmatranih odziva: sadržaj rezidualnog ugljenika, 8,2643 g/l; sadržaj rezidualnog azota, 0,1723 g/l; sadržaj suve materije 1,5023 g/l; sadržaj rezidualnih fosfata 0,5167 g/l; pečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13, 43,02 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12, 45,55 mm. Na osnovu ovih rezultata jasno je da se maksimalna produkcija antagonističkih agenasa efikasni na izolate vrste *F. avenaceum* takođe ostvaruje u 96 h kultivacije, ali pri nižim vrednostima intenziteta aeracije i brzine mešanja.

Tabela 5.25. Drugi set optimizacije: uslovi i dobijene optimalne vrednosti

Nezavisne promenljive		vrednosti
Brzina mešanja (o/min)	u opsegu	100
Intenzitet aeracije (l/l/min)	u opsegu	1,2
Vreme kultivacije (h)	u opsegu	96
Zavisne promenljive		Predviđene vrednosti
Rezidualni glicerol (g/l)	u opsegu	8,2643
Rezidualni azot (g/l)	u opsegu	0,1723
Rezidualni fosfati (g/l)	u opsegu	0,5167
Suva materija (g/l)	u opsegu	1,5023
<i>A. alternata</i> KA10 (mm)	u opsegu	62,63
<i>A. alternata</i> T1Jg3 (mm)	u opsegu	61,09
<i>F. avenaceum</i> KA12 (mm)	maksimalan	45,55
<i>F. avenaceum</i> KA13 (mm)	maksimalan	43,02
<b>Ukupna željena funkcija</b>		<b>0,674</b>

U trećem setu optimizacije cilj je bio da se definišu optimalne vrednosti ispitivanih parametara ukoliko se bioproces vodi sa ciljem postizanja maksimalnih vrednosti prečnika zona inhibicije rasta micelije sva četiri test izolata (*A. alternaria* KA10 i T1Jg3 i *F. avenaceum* KA12 i KA13).

Rezultati trećeg seta prikazani u tabeli 5.26. pokazuju da primenom optimalnih vrednosti ispitivanih faktora: brzina mešanja 100 o/min; intenziteta aeracije 1,2 l/l/min i vremena kultivacije 96 h, dobijamo željenu funkciju čija je maksimalna vrednost 0,702. Vrednosti posmatranih odziva koji se dobijaju primenom ovih, modelom predviđenih vrednosti su: sadržaj rezidualnog glicerola, 8,2645 g/l; sadržaj rezidualnog azota, 0,1723 g/l; sadržaj suve materije 1,5023 g/l; sadržaj rezidualnih fosfata 0,5167 g/l; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3, 61,09 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10, 62,62 mm; pečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13, 43,02 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12, 45,55 mm.

Tabela 5.26. Treći set optimizacije: uslovi i dobijene optimalne vrednosti

Nezavisne promenljive		vrednosti
Brzina mešanja (o/min)	u opsegu	100
Intenzitet aeracije (l/l/min)	u opsegu	1,2
Vreme kultivacije (h)	u opsegu	96
Zavisne promenljive		Predviđene vrednosti
Rezidualni glicerol (g/l)	u opsegu	8,2645
Rezidualni azot (g/l)	u opsegu	0,1723
Rezidualni fosfati (g/l)	u opsegu	0,5167
Suva materija (g/l)	u opsegu	1,5023
<i>A. alternata</i> KA10 (mm)	maksimalan	62,63
<i>A. alternata</i> T1Jg3 (mm)	maksimalan	61,09
<i>F. avenaceum</i> KA12 (mm)	maksimalan	45,55
<i>F. avenaceum</i> KA13 (mm)	maksimalan	43,02
<b>Ukupna željena funkcija</b>		<b>0,702</b>

Rezultati dobijeni u trećem setu optimizacije poklapaju se sa rezultatima dobijenim u drugom setu zbog čega su predviđeni prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata vrste *F. avenaceum* bliske maksimalno ostvarenim vrednostima, dok su prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata vrste *A. alternata* nešto niži. Svakako, ovi rezultati ukazuju na mogućnost skraćenja trajanja kultivacije na 96 h, čime se uvećava tehno-ekonomska efikasnost bioprocasa.

## 5.11. PROVERA VALIDNOSTI DOBIJENIH REZULTATA U UVEĆANIM RAZMERAMA

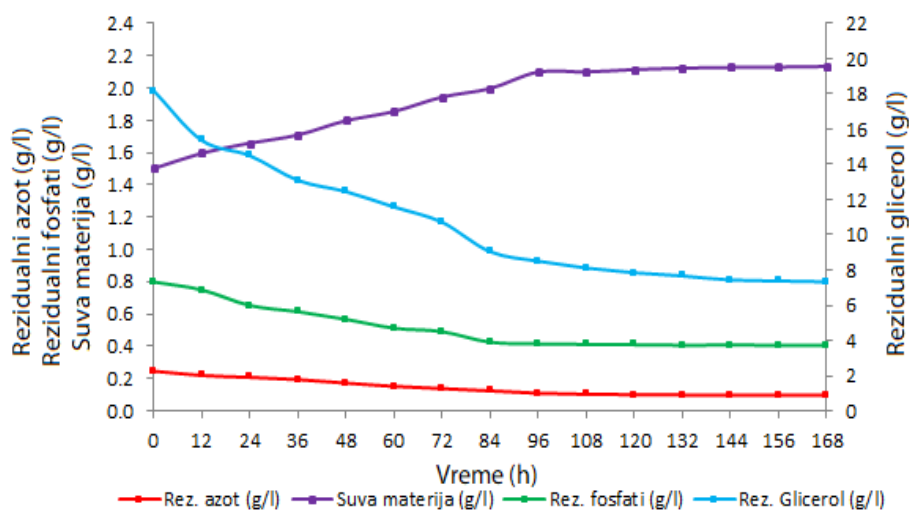
U ovom segmentu istraživanja cilj je bio da se isprati tok kultivacije i izvrši provera validnosti rezultata optimizacije u uvećanim razmerama. Za validaciju dobijenih optimizacionih rezultata korišćen je laboratorijski bioreaktor (Chemap AG CH-8604, Volketswil, Switzerland) zapremine 7 l i radne zapremine 5 l. Kultivacija je izvršena na podlozi optimalnog sastava pri optimalnim uslovima variranih procesnih parametara u trajanju od 168 h na konstantnoj temperature od  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  koja je interno regulisana. Mešanje kultivacione tečnosti tokom eksperimenta podešeno je na 100 o/min i omogućeno je primenom dve paralelno postavljene Ruštonove turbine, dok je sistemom za aeraciju omogućeno održavanje protoka vazduha od 1,2 l/l/min.

### 5.11.1. ISPITIVANJE POTROŠNJE SUPSTRATA I PORASTA BIOMASE TOKOM BIOPROCASA

Tokom trajanja bioprocasa u tačno definisanim vremenskim intervalima vršeno je uzorkovanje kultivacione tečnosti sa ciljem praćenja toka biosinteze antagonista skladišnih



patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus* (slika 5.25). U ove svrhe ispitani su sadržaji rezidualnog glicerola, rezidualnog azota, rezidualnog fosfata i suve materije.

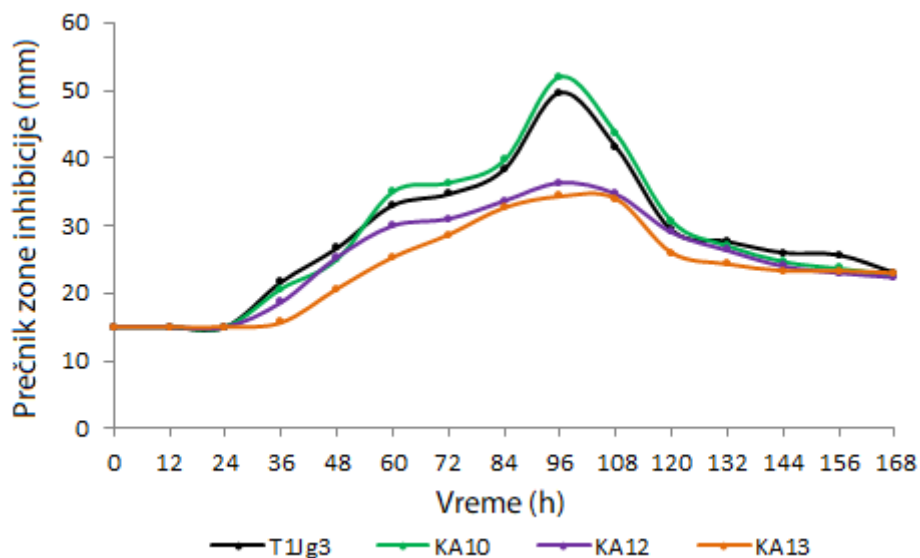


Slika 5.25. Tok kultivacije *S. hygroscopicus* u biorektoru uvećanih razmera

Rezultati prikazani na slici 5.25. pokazuju da se intenzivna potrošnja sva tri nutrijenta uočava do 84 h kultivacije nakon čega se nutrijenti do kraja bioprocesa i dalje troše, ali nešto manjom brzinom, što je očekivano s obzirom da mikroorganizam ulazi u stacionarnu fazu rasta. U skladu sa ovim, porast biomase ćelija je najintenzivniji do četvrtog dana nakon čega se usporava da bi do kraja bioprocesa imao vrednost 2,13 g/l. Takođe, sadržaj suve materije pokazuje trend povećanja od samog početka bioprocesa. Nedostatak *lag* faze može biti posledica prisustva veoma povoljnih uslova koji vladaju u biorektoru, a koji pogoduju rastu proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus*. Takođe, nutrijenti koji su prisutni u podlozi se vrlo lako usvajaju od strane proizvodnog mikroorganizma što doprinosi njegovom brzom rastu i razmnožavanju tokom eksponencijalne faze rasta. Rezidualne vrednosti izvora ugljenika, azota i fosfora na kraju bioprocesa dostižu vrednosti od 7,33 g/l, 0,097 g/l i 0,407 g/l, respektivno.

### 5.11.2. ISPITIVANJE DELOVANJA PROIZVEDENIH ANTAGONISTIČKIH AGENASA *in vitro*

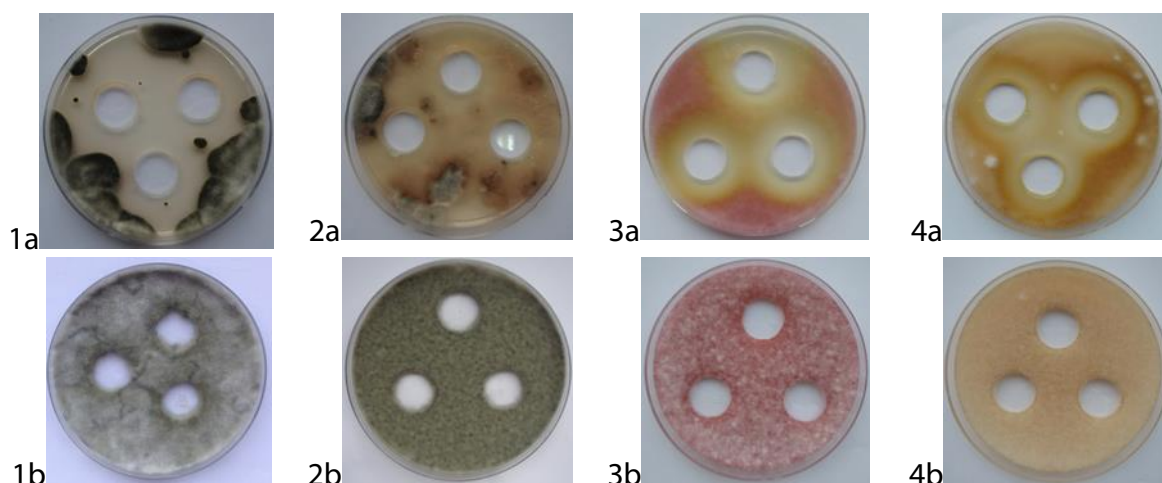
Podaci o efikasnosti bioprocesa proizvodnje antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygroscopicus* dobijeni su testiranjem supernatanta kultivacione tečnosti *in vitro* na četiri izolata skladišnih patogena jabuke, dva vrste *A. alternata* (T1Jg3 i KA10) i dva vrste *F. avenaceum* (KA12 i KA13). Ispitivanje je vršeno na svakih 12 h kultivacije difuzionom metodom sa bunarima. Na slici 5.26. prikazani su rezultati prečnika zone inhibicije dobijena kao srednja vrednost tri ponavljanja tokom 7 dana trajanja bioprocesa u biorektoru uvećanih razmera sa brzinom mešanja 100 o/min i intenzitetom aeracijom 1,2 l/l/min primenom *S. hygroscopicus*.



Slika 5.26. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije na četiri test izolata dobijena delovanjem supernatanta kultivacione tečnosti u bioreaktoru uvećanih razmera

Prikazani rezultati pokazuju da se maksimalna produkcija željenih antagonističkih agenasa registruje u 96 h kultivacije pri čemu u tom vremenskom intervalu sva četiri testirana fitopatogena izolata pokazuju najveće zone inhibicije rasta micelije (slika 5.27). Izolati vrste *A. alternata* pokazuju veću osetljivost na produkovane antagonističke agense u odnosu na izolate vrste *F. avenaceum*. Ovi rezultati su očekivani s obzirom da su slični rezultati dobijeni i u istraživanjima u manjim zapreminama suda (poglavlje 5.9.2). Dakle, najveća osetljivost registruje se kod izolata *A. alternata* KA10 sa formiranim prečnikom zone inhibicije od 52 mm, zatim sledi izolat *A. alternata* T1Jg3 sa formiranom zonom od 49,67 mm, dok znatno manje zone formiraju izolati *F. avenaceum* KA12 i *F. avenaceum* KA13 od 36,33 mm i 34,33 mm, respektivno.

Analizirajući dijagram toka kultivacije (slika 5.25.) uočava se da eksponencijalna faza rasta proizvodnog mikroorganizma traje do 84 h kultivacije kada nastupa stacionarna faza. Već na samom početku stacionarne faze (u 96 h kultivacije) registruje se maksimalna produkcija željenih antagonista (slika 5.26.). Rezultati dobijeni optimizacijom procesnih parametara i vremena kultivacije (poglavlje 5.10.2.) ukazali su da je optimalno trajanje kultivacije upravo 96 h (tabela 5.26). Na slici 5.27. prikazane su Petri ploče sa inhibicijom rasta micelije sva četiri testirana skladišna patogena jabuke u 96 h kultivacije kao i kontrolne ploče za svaki od izolata.



Slika 5.27. Inhibicija rasta micelije primenom *S. hygroscopicus* (a) i kontrola (b)  
 (1) *A. alternata* KA10; (2) *A. alternata* T1Jg3; (3) *F. avenaceum* KA12; (4)  
*F. avenaceum* KA13

### 5.11.3. POREĐENJE EKSPERIMENTOM ODREĐENIH I MODELOM PREDVIĐENIH VREDNOSTI ANALIZIRANIH PARAMETARA BIOPROCESA

Kao što je rečeno, po završetku kultivacije svi prikupljeni uzorci su analizirani u pogledu parametara kojima je ispraćen tok kultivacije, porast biomase ćelija proizvodnog mikroorganizma kao i efikasnosti produkovanih antagonističkih agenasa na izolate vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*. Eksperimentalne vrednosti dobijene u 96 h kultivacije upoređene su sa modelom predviđenim vrednostima i dobijeni su odgovarajući stepeni poklapanja (tabela 5.27).

Tabela 5.27. Poređenje modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti

	Eksperimentalno određene vrednosti	Modelom predviđene vrednosti	Stepen poklapanja (%)
Rezidualni glicerol (g/l)	8,5100	8,2645	97,12
Rezidualni azot (g/l)	0,1111	0,1713	64,84
Rezidualni fosfati (g/l)	0,4160	0,5167	80,50
Suva materija (g/l)	2,1003	1,5023	71,53
<i>A. alternata</i> KA10	52,00	62,62	83,04
<i>A. alternata</i> T1Jg3	49,67	61,09	81,31
<i>F. avenaceum</i> KA12	36,33	45,55	79,76
<i>F. avenaceum</i> KA13	34,33	43,02	79,80

Poređenjem eksperimentalno dobijenih rezultata sa modelima predviđenim vrednostima može se uočiti da je produkcija željenih antagonističkih agenasa u biorektoru uvećanih razmera nešto manja u odnosu na modelom predviđene vrednosti za bioreaktor manje zapremine. Slične rezultate dobili su i Okada i Iwamatu proučavajući *scale up* kod

proizvodnje milbemicina primenom *S. hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*. Oni su takođe uočili da se veća količina ovog antibiotika produkuje u bioreaktoru manje zapremine suda, te da je proizvodnja u bioreaktoru uvećanih razmera redukovana na 64,5% ukupnog prinosa dobijenog u bioreaktoru manje zapremine (Okada i Iwamatu, 1997).

U pogledu potrošnje osnovnih nutrijenata podloge iz tabele 5.27. uočava se da je u odnosu na modelom predviđene vrednosti potrošnja izvora azota i fosfata u eksperimentu izvedenom u bioreaktoru uvećanih razmera bila veća dok je potrošnja glicerola bila nešto manja. Međutim, stepen poklapanja potrošnje izvora ugljenika u eksperimentalnim i modelom predviđenim vrednostima je čak 97,12%. U skladu sa povećanjem potrošnje supstrata, u eksperimentu izvedenom u uvećanim razmerama suda proizvedena je i veća količina biomase ćelija proizvodnog mikroorganizma u odnosu na modelom predviđene vrednosti. Ovako dobijeni rezultati poklapaju se sa naučno dostupnim podacima u kojima su Okaida i Iwamatu ustanovili da se količina proizvedene biomase ćelija u eksperimentu izvedenom u bioreaktoru uvećanih razmera povećala oko 15% u odnosu na rezultate dobijene u bioreaktoru malih zapremina (Okada i Iwamatu, 1997).

Svakako, postoji više razloga zbog kojih primena istih uslova u bioreaktoru male zapremine suda i bioreaktoru sa uvećanom zapreminom suda ne daju iste rezultate. Naime, bioprocesi koji se izvode u velikim bioreaktorima se uvek suočavaju sa problemom mešanja ili prenosa mase koji se često ne javlja u laboratorijskim bioreaktorima malih zapremina. Neki aspekti se neizbežno menjaju tokom procesa *scale up*-a, a najznačajniji su svakako uticaj pritiska usled povećanja stuba tečnosti, vreme mešanja, intenzitet aeracije, temperatura, vrednost pH, što utiče na morfologiju pa samim tim i na produktivnost proizvodnog mikroorganizma (Xia i sar., 2015). Kao što je već rečeno, stopa prenosa kiseonika kod submerznih aerobnih kultivacija može da kontroliše ukupnu brzinu bioprocasa, zbog čega se upravo mešanje i aeracija najčešće uzimaju kao glavni parametri proučavanja prilikom procesa *scale up*-a (Garcia-Ochoa i Gomez, 2009). Da bi se predvideli rezultati koji će se dobiti u bioreaktoru industrijskih razmera, veoma je bitno prethodno izvršiti *scale up* sa laboratorijskog nivoa na nivo pilot postrojenja i izvršiti pažljivu analizu uticaja operativnih uslova na biološko ponašanje sistema (Garcia-Ochoa i Gomez, 2009).

#### 5.11.4. ISPITIVANJE DELOVANJA PROIZVEDENIH ANTAGONISTIČKIH AGENASA *in planta*

Kako bi se efikasnost produkovanih metabolita sa antagonističkom aktivnošću na izolate *A. alternata* KA10 i T1Jg3 i *F. avenaceum* KA12 i KA13 potvrdila *in planta*, u okviru ove faze istraživanja izvršeno je ispitivanje na veštački inokulisanim plodovima jabuke. Za istraživanje su korišćene jabuke sorte Zlatni delišes približno istih veličina koje su nakon inokulacije inkubirane 10 dana u vlažnoj sredini, na sobnoj temperaturi. Otvori su pre veštačke inokulacije fitopatogenim gljivama zaštićeni isključivo supernatantom

kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus* dobijenim uzorkovanjem posle 96 h kultivacije jer se on pokazao kao najpogodniji u *in vitro* ogledu. Nakon perioda inkubacije meren je prečnik nekroze, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.28.

Tabela 5.28. Srednje vrednosti prečnika nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke nakon 10 dana inkubacije

Patogen	Prečnik nekroze $\pm$ Sd (mm)	
	Veštački inokulisani plodovi	Kontrolni uzorci
<i>A. alternata</i> KA10	4,33 $\pm$ 0,57	19,33 $\pm$ 0,58
<i>A. alternata</i> T1Jg3	5,00 $\pm$ 1,00	19,67 $\pm$ 0,58
<i>F. avenaceum</i> KA12	6,67 $\pm$ 0,57	18,67 $\pm$ 0,58
<i>F. avenaceum</i> KA13	7,67 $\pm$ 1,15	16,67 $\pm$ 1,15

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da su prečnici nekroze registrovani na veštački inokulisanim plodovima jabuke prethodno tretiranim kultivacionom tečnošću u odnosu na prečnike nekroze zabeležene na netretiranim, veštački inokulisanim plodovima koje su služile kao kontrolni uzorci 4,64, 3,93, 2,80 i 2,17 puta manji za različite ispitivane patogene. Ovo ukazuje na činjenicu da antagonistički agensi produkovani primenom *S. hygroscopicus* u bioreaktoru pod tačno definisanim, prethodno optimizovanim uslovima, i na podlozi optimalnog sastava, pokazuju veoma dobro delovanje na skladišne patogene jabuka *A. alternata* KA10 i T1Jg3 i *F. avenaceum* KA12 i KA13.

Dakle, proizvodni mikroorganizam *S. hygroscopicus* pokazao je izuzetan potencijal u kontroli fitopatogenih izolata vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*. Potvrdu o velikom potencijalu *S. hygroscopicus* u kontroli fitopatogenih gljiva dali su i drugi naučnici u *in vivo* istraživanjima na različitim biljnim vrstama. Naime, Prapagdee i saradnici su ispitivali potencijal ove aktinomicete na orhidejama dok su Shimizu i saradnici istraživali njen potencijal na krastavcu (Prapagdee i sar., 2008; Shimizu i sar., 2009). Takođe, Ismet i saradnici su ispitivali potencijal različitih aktinomiceta na plodovima banana (Ismet i sar., 2012). U svim navedenim slučajevima kao patogen ispitivane su fitopatogene vrste roda *Colletotrichum*. Međutim, u naučnoj literaturi nema podataka o delovanju *S. hygroscopicus* na skladišne patogene jabuke iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* što ovom istraživanju daje veliki naučni značaj.

## ZAKLJUČCI

---

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imala su za cilj optimizaciju biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum* primenom proizvodnog mikroorganizma *S. hygrosopicus*. Na osnovu postavljenih specifičnih ciljeva ove doktorske disertacije i dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- ✓ Izolati koji su korišćeni kao test organizmi izolovani su iz plodova jabuka sa simptomima truleži uzorkovani tokom 2012. godine iz Ultra Low Oxygen hladnjači na teritoriji Republike Srbije (AP Vojvodina). Patogeni su izolovani koristeći standardne fitopatološke tehnike. Iz kolekcije čistih kultura izabrane su one za koje se sa sigurnošću na osnovu mikro i makromorfoloških karakteristika moglo utvrditi da pripadaju rodovima *Alternaria* i *Fusarium*. Patogenost odabranih izolata *Alternaria* sp. i *Fusarium* sp., proverena je veštačkom inokulacijom plodova jabuke sorte Zlatni delišes. Molekularna identifikacija izolata *Alternaria* sp. i *Fusarium* sp. izvršena je metodom lančane reakcije polimeraze primenom para univerzalnih ITS1 i ITS4 prajmera pri čemu je detaljnom analizom utvrđeno da dva izolata (KA10 i T1Jg3) pripadaju vrsti *A. alternata* dok dva izolata (KA12 i KA13) pripadaju vrsti *F. avenaceum*.
- ✓ Poređenjem proizvodne sposobnosti *S. hygrosopicus* sa drugim potencijalnim producerima antagonista skladišnih patogena jabuke (*Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus* i *Saccharomyces cerevisiae*), utvrđeno je da *S. hygrosopicus* ima najveći potencijal kao antagonista skladišnih patogena jabuke vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*, te je u daljem istraživanju korišćen kao proizvodni mikroorganizam u proizvodnji antifungalnih agenasa namenjenih za kontrolu ovih vrsta skladišnih patogena jabuke.
- ✓ Rezultati odabira optimalne vrednosti pH i osmotskog pritiska podloge za kultivaciju *S. hygrosopicus*, pokazali su da je za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke najpogodnija neutralna sredina (pH=7±0,1). Osmotski pritisak u podlozi regulisan je količinom soli NaCl i ispitivanjem je utvrđeno je da se količina soli NaCl od 0,3% u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*, pokazala kao najpogodnija.
- ✓ Deo istraživanja koji je za cilj imao odabir optimalnih izvora ugljenika i azota u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke obuhvatio je ispitivanje različitih kombinacija izvora ugljenika i azota. Od izvora ugljenika ispitano je šest izvora koji predstavljaju najvažnije monosaharide (glukoza i fruktoza), disaharide (laktoza i maltoza), polisaharid (skrob) i alkohol (glicerol), koji su se međusobno kombinovali sa ispitivanim izvorima azota: sojino brašno, ekstrakt kvasca, pepton, NaNO<sub>3</sub> i bez azota. Analizom dobijenih rezultata zaključeno je da se podloga za kultivaciju *S. hygrosopicus* koja je sadržala glicerol i pored već prisutnog azota u podlozi nije sadržala dodatni izvor azota (Gy+bez N), pokazala kao najpogodnija za produkciju željenih antagonističkih agenasa efikasnih protiv izolata vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*.

- ✓ Definisani matematički modeli koje opisuju uticaj odabranih variranih parametara (sadržaj glicerola,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) na uspešnost biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke (prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata *A. alternate* KA10 i T1Jg3 i izolata *F. avenaceum* KA12 i KA13) i parametara toka bioprocesa (rezidualni glicerol, rezidualni azot i rezidualni fosfati) primenom *S. hygrosopicus*, dobijeni su primenom postupka odzivne površine u skladu sa Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom i rezultatima dobijenim u eksperimentima izvedenim u malim zapreminama suda pod tačno definisanim uslovima. Dobijene visoke vrednosti (veće od 0,900) koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) ukazuju na veoma dobro fitovanje eksperimentalnih rezultata, a rezultati analize varijanse pokazuju da su definisani modeli statistički značajni u interval poverenja 95% ( $p < 0,05$ ).
- ✓ Dobijeni matematički modeli u kombinaciji sa primenom metode željene funkcije korišćeni su za optimizaciju sastava podloge odnosno, definisanje optimalnih količina odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora u hranljivoj podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*. Ukoliko se kao uslov optimizacije definiše dobijanje najvećeg prinosa željenih antagonističkih agenasa koji se ogleda u dobijanju maksimalnih mogućih prečnika zona inhibicije rasta micelije izolata vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*, željena funkcija ima najveću vrednost 0,96. Primenom definisanih optimalne vrednosti ispitivanih faktora, sadržaj glicerola od 20 g/l, sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 0,25 g/l i sadržaj  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  od 1,41 g/l u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus*, model predviđa sledeće vrednosti parametara toka i parametara uspešnosti biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke: rezidualni glicerol od 5,3418 g/l; rezidualni azot od 0,193 g/l; rezidualni fosfati od 0,8601 g/l; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 od 28,22 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 od 36,86 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 od 25,54 mm i prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13 od 26,78 mm.
- ✓ Rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja različitog intenziteta aeracije i brzine mešanja na biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus* u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 3 l korišćeni su za modelovanje i optimizaciju procesnih parametara važnih za sadržaj rastvorenog kiseonika u hranljivoj podlozi. Kao nezavisne promenljive korišćeni su brzina mešanja (100-300 o/min), intenzitet aeracije (0,5-1,5 l/l/min) i vreme kultivacije u kome je registrovana najveća produkcija željenih antagonista (96-144 h) i varirani su po punom eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Definisani matematički modeli koje opisuju uticaj odabranih procesnih parametara na uspešnost bioprocesa (prečnici zona inhibicije rasta micelije izolata *A. alternate* KA10 i T1Jg3 i izolata *F. avenaceum* KA12 i KA13) i parametare toka bioprocesa (rezidualni glicerol, rezidualni azot, rezidualni fosfati i sadržaj suve materije), pokazuju da su dobijene vrednosti



koeficijenta determinacije veoma visoke (iznad 0,900). Metoda željene funkcije u kombinaciji sa dobijenim matematičkim modelima korišćeni su za optimizaciju procesnih parametara važnih za sadržaj rastvorenog kiseonika u podlozi za kultivaciju *S. hygrosopicus*. Ukoliko se kao cilj optimizacije definiše dobijanje maksimalnih prečnika zona inhibicije rasta micelije četiri test skladišna patogena vrsta *A. alternata* i *F. avenaceum*, željena funkcija ima vrednost 0,702. Primenom definisanih optimalne vrednosti ispitivanih faktora, brzine mešanja od 100 o/min, intenziteta aeracije od 1,2 l/l/min i 96h kao optimalno vreme trajanja kultivacije *S. hygrosopicus*, model predviđa sledeće vrednosti parametara toka i parametara uspešnosti biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke: rezidualni glicerol od 8,2645 g/l; rezidualni azot od 0,1723 g/l; rezidualni fosfati od 0,5167 g/l; suva materija 1,5023; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 od 62,62 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 od 61,09 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 od 45,55 mm i prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13 od 43,02 mm.

- ✓ Izvođenjem biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke na podlozi optimalnog sastava i primenom optimalnih procesnih parametara izvedena je u laboratorijskom bioreктору standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 7 l u cilju provere validnosti dobijenih rezultata i utvrđivanja stepena poklapanja eksperimentalno dobijenih sa modelom predviđenim vrednostima. Dobijeni rezultati ukazuju na visok stepen poklapanja, a efikasnost produkovanih antagonističkih agenasa efikasnih na izolate *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) i *F. avenaceum* (KA12 i KA13) pored *in vitro*, potvrđena je i u *in planta* ogledima.

## **7. LITERATURA**

---

Adinarayana K, Ellaiah P, Srinivasulu B, Bhavani Devi R, Adinarayana G (2003): Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 38: 1565-1572.

Aggelis G (2009): *Microbial conversions of raw glycerol*. Nova Science Publishers, Inc., New York.

Aghighi S, Shahidi Bonjar GH, Rawashdeh R, Batayneh S, Saadoun I (2004): First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (4): 463-471.

Al-Askar AA, Abdul Khair WM, Rashad YM (2011): In vitro antifungal activity of *Streptomyces spororaveus* RDS28 against some phytopathogenic fungi. *African Journal of Agricultural Research*, 6(12): 2835-2842.

Ali MA, El Gammal AA, Rifaat MH (2014): Influence of nutrition and culturing conditions on antimicrobial metabolite production by *Streptomyces mesioensis* isolated from Egyptian soil. *International Journal of ChemTech Research*, 6 (4): 2552-2557.

Amin M, Malik AU, Khan AS, Javed N (2011): Potential of fungicides and plant activator for postharvest disease management in mangoes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13: 671–676

Anderson AS, Wellington EMH (2001): The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 797-814.

Antony-Babu S, Goodfellow M (2008): Biosystematics of alkaliphilic *streptomycetes* isolated from seven locations across a beach and dune sand system. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94: 581-591.

Baras J, Veljković V, Popov S, Povrenović D, Lazić M, Zlatković B (2009): *Osnovi bioprocenog inženjerstva*. Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac.

Battilani P, Costa LG, Dossena A, Gullino ML, Marchelli R, Galaverna G, Pietri A, Dall'Asta C, Giorni P, Spadaro D, Gualla A (2009): Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants, CFP/EFSA/CONTAM/2008/01, Scientific technical report submitted to EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/24e.pdf>

Berdy J (2005): Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.

Berrie AM (2013): *Apple: Studies on Fusarium species causing core rots and storage rots*. Final project report TF 203.

- Bibb M (2005): Regulation of secondary metabolism in *streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 208-215.
- Bibb MJ (2005): Regulation of secondary metabolism in streptomyces. *Current Opinion in Microbiology*, 8 (2): 208-215.
- Birch A, Hausler A, Hutter R (1990): Genome Rearrangement and Genetic Instability in *Streptomyces* spp. *Journal of Bacteriology*, 172: 4138-4142.
- Blagojević J, Oro V, Nikolić I, Popović T, Aleksić G, Gavrilović V, Ivanović Ž (2014): Morfofiziološka proučavanja izolata *Alternaria* spp. poreklom sa celera. *Plant Protection*, 65 (1): 15-26.
- Borovička B (2012): Izolacija i strukturna karakterizacija novih poliketida, derivata antrona dobijenih biosintezom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Zagrebu, Fakultet hemijskog inženjerstva i tehnologije.
- Bradley N (2007): The response surface methodology. Master Thesis, Department of Mathematical Sciences, Indiana University of South Bend.
- Brzonkalik K, Herrling T, Syldatk C, Neumann A (2011): The influence of linebreak different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 120–126.
- Bulajic A, Filajdic N, Babovic M, Sutton TB (1996): First report of *Alternaria mali* on apples in Yugoslavia. *Plant Disease Journal*, 80: 709.
- Burgess LW, Summerell AB, Bullock S, Gott PK, Backhouse D (1994): Laboratory for *Fusarium* research, Third Edition. University of Sydney and Royal Botanic Gardens, 133.
- Carter HE, Gottlieb D, Anderson HW (1948): Chloromycetin and Streptothricin. *Science*, 107: 113.
- Castoria R, Wright AIS, Droby S (2008): Biological Control of Mycotoxigenic Fungi in Fruits, Micotoxins in fruit and vegetables. Chapter ,16: 311-333.
- Cawoy X, Bettiol W, Fickers P, Ongena M (2011): *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management* (Ed. Stoytcheva, M.), 273-302.
- Chen X, Tang L, Li S, Liao L, Zhang J, Mao Z (2011): Optimization of medium for enhancement of e-Poly-L-Lysine production by *Streptomyces* sp. M-Z18 with glycerol as carbon source. *Bioresource Technology*, 102: 1727-1732.
- Chou H, Wu W (2002): Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, 106: 164-169.

Cross T (1989): Growth and examination of Actinomycetes – some guidelines. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Company, Baltimore, Vol. 4: 2340–2343.

da Silva GP, Mack M, Contiero L (2009): Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27: 30–39.

Dhingra OD, Sinclair JB (1995): *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, USA, 61.

Diminić J (2007): Izrada računalnog programa za prikupljanje, obradu, pohranu i grafiki prikaz bioloških podataka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Đisalov J (2015): Identifikacija *Alternaria* spp. na zrnu spelte i uticaj zaraze na komponente prinosa, sadržaj mikotoksina i tehnološki kvalitet. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Dodić J, Grahovac J (2013): *Industrijska mikrobiologija: praktikum*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.

Dodić J, Grahovac J, Tadijan I, Dodić S, Vučurović D, Popov S: Screening of antibiotics production by *Streptomyces* spp. strains isolated from the environment. In *Proceedings of the Forth Joint UNS – PSU International Conference on BioScience: Biotechnology and Biodiversity*, 2012, Novi Sad, Serbia, pp. 145-149.

Dodić S, Popov S (2011): *Bioprocena oprema*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.

Doumbou CL, Hamby Salove MK, Crawford DL, Beaulieu C (2001): Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and promote plant growth. *Phytoprotection*, 82 (3): 85-102.

Dufour N, Rao RP (2011): Secondary metabolites and other small molecules as intercellular pathogenic signals. *FEMS Microbiology Letters*, 314: 10-17.

Elibol M (2004): Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with response surface methodology. *Process Biochemistry*, 39: 1057–1062.

Elles R, Mountford R (2003): *Molecular diagnosis of genetic disease* 2nd edn. Humana Press, New Jersey.

El-Sayed Shalaby M, Fathi El-Nady M (2008): Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(2): 271-275.

Feng Y, Heb Z, Leong Onga S, Hua J, Zhangb Z, Jern Nga W. (2002): Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum-mannanase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 282-289.

Ferreira SLC, Korn MDAG, Ferreira HS, da Silva EGP, Araujo RGO, Souza AS, Macedo SM, Lima DDC, de Jesus RM, Amorim FAC, Sendra JMB (2007): Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42: 475-491.

Filajdić N, Sutton TB (1995): Overwintering of *Alternaria mali*, the Causal Agent of *Alternaria* Blotch of Apple. *Plant Disease*, 79 (7): 695-698.

Firn RD, Jones CG (2000): The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Molecular Microbiology*, 37: 989-994.

Gales ME Jr, Julian EC, Kroner RC (1966): Method of quantitative determination of total phosphorus in water. *Journal of America Water Works Association*, 58: 1363-1368.

Gallo M, Katz E (1972): Regulation of secondary metabolite biosynthesis catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *Journal of Bacteriology*, 109,: 659-667.

Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X, Liu X, Zhuo Y, Zhang W, Zhang L (2009): Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 100 (17): 4012-4016.

Gao LL, Zhang Q, Sun XY, Jiang L, Zhang R, Sun GY, Zha YL, Biggs Alan R (2013): Etiology of moldy core, core browning, and core rot of fuji apple in China. *Plant Disease*, 97: 510-516.

Garcia-Ochoa F, Gomez E (2009): Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* 27: 153-176.

Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R (2005): Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological Research*, 160: 243-248.

Gilden RC, Huffling K, Sattler B (2010): Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 39:103-110.

Gopalakrishnan S, Pande S, Sharma M, Humayun P, Keerthi Kiran B, Sandeep D, Sree Vidya M, Deepthi K, Rupela O (2011): Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection*, 30: 1070-1078.

Gottschalk MFL, Nobrega R, Bon PSE (2003): Effect of Aeration on Lignin Peroxidase Production by *Streptomyces viridosporus* T7A. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108.

Grahovac J, Grahovac M, Dodić J, Bajić B, Balaž J (2014): Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*, *Crop Protection*, 65: 143-152.

Grahovac M (2014): Biološko suzbijanje *Colletotrichum* spp. parazita uskladištenih plodova jabuke. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Grahovac M, Balaž J, Grahovac J, Dodić J, Tanović B, Hrustić J, Tadijan I (2014): Screening of antagonistic activity of selected microorganisms against apple rot pathogens. *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (1): 8959-8965.

Grahovac M, Inđić D, Lazić S, Vuković S (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Journal Pesticides and Phytomedicine*, 24(4): 245-258.

Grahovac M, Inđić D, Tanović B, Lazić S, Vuković S, Hrustić J, Gvozdenac S (2011): Integralna zaštita jabuka od prouzrokovala truleži u skladištima. *Journal Pesticides and Phytomedicine*, 26(4): 289-299.

Grahovac SM, Grahovac AJ, Tadijan ŽI, Dodić MJ, Balaž SJ: Possibility of biofungicide production from waste glycerol. 2nd International Conference: WASTES: Solutions, Treatments and Opportunities, 11-13 September 2013, Braga, Portugal, pp. 311-316.

Hafizi R, Salleh B, Latiffah Z (2013): Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (3): 959-968.

Hall TA, (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Harteveld DOC, Akinsanmi OA, Drenth A (2013): Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology*, 62: 289-297.

Harteveld DOC, Akinsanmi OA, Drenth A (2014): Pathogenic variation of *Alternaria* species associated with leaf blotch and fruit spot of apple in Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 139:789-799.

Harteveld DOC, Akinsanmi OA, Chandra K, Drenth A (2014a): Timing of Infection and Development of *Alternaria* Diseases in the Canopy of Apple Trees. *Plant Disease*, 98 (3): 401-408.

Heinzle E, Biwer PA, Cooney LC (2006): Development of Sustainable Bioprocesses Modeling and Assessment. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.

Herlich K (1990): Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, fifth ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, pp. 758-759.

Hokkanen HMT, Menzler-Hokkanen I, Lahdenperä ML (2015): Managing Bees for Delivering Biological Control Agents and Improved Pollination in Berry and Fruit Cultivation. *Sustainable Agriculture Research*; Vol. 4 (3): 89-102.

Holt GJ, Krieg N, Sneeth RP, Staley HAJ, Williams T. (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Hong SG, Cramer R.A, Lawrence,C.B, Pryor BM (2005): Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics Biology*, and 42: 119-129.

Hopwood AD (2007): *Streptomyces* in Nature and Medicine - The Antibiotic Makers. John Innes Centre, Oxford University Press, Inc., New York.

Hopwood DA, Chater KF, Bibb MJ (1995): Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2), a model streptomycete. *Biotechnology*, 28: 65-102.

Horlock C (2006): Management of *Alternaria* leaf and fruit spot in apples. Horticulture Australia, Sydney, Australia.

Ilić S, Konstantinović S, Savć D, Veljković V, Joković N, Gojgić-Cvijović G (2014): The influence of modified media with carboxymethyl cellulose on morphology and antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 578-580.

Ilić S, Konstantinović S, Savić D, Veljković V, Joković N, Gojgić-Cvijović G (2008): The influence of modified media with carboxymethyl cellulose on morphology and antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biotechnology and Biotechnology*, 578-580.

Ismet A, Rizwana H, Al-Othman RM, Bakir AM (2012): Studies of actinomycetes for biological control of *Colletotrichum musae* pathogen during post-harvest anthracnose of banana. *African Journal of Microbiology Research*, 6(17): 3879-3886.

Jagani H, Hebbar K, Gang SS, Raj PV, Chandrashekar HR, Rao JV (2010): An Overview of Fermenter and the Design Considerations to Enhance Its Productivity. *Pharmacologyonline*, 1: 261-301.

James PD, Edwards C, Dawson M (1991): The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. *Journal of General Microbiology*, 137: 1715-1720.

Jasnić S, Marjanović Ž, Vidić M, Bagi F, Budakov D, Pavlović S, Stojšin V (2011): Pathogenic, morphological and molecular characteristics of *Alternaria tenuissima* from soybean. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci, Matica Srpska*, 120: 181-194.

Jicheng Y, Qiu L, Qiao L, Xiangdong L, Qiang S, Jianfang Y, Xiaohui Q, Shengdi F (2008): Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*, 99: 2087–2091.

Jing D (2010): Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. *Bioresource Technology*, 101: 7592–7597.



Jokić A (2010): Modelovanje "Cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Jokić A, Zavargo Z, Šereš Z, Tekić M (2010): The effect of turbulence promoter on cross-flow microfiltration of yeast suspensions. A response surface methodology approach. *Journal of Membrane Science*, 15: 269-78.

Jonsbu E, McIntyre M, Nielsen J (2002): The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotechnology*, 95: 133–144.

Kang JC, Crous WP, Mchau RAG, Serdani M, Song SM (2002): Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research*, 106 (10): 1151–1162.

Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S (2009): Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology*, 6(3): 143-147.

Kim HY, Kim JD, Hong JS, Ham JH, Kim BS (2013): Identification of antifungal niphimycin from *Streptomyces* sp. KP6107 by screening based on adenylate kinase assay. *Journal of Basic Microbiology*, 53: 581–589.

KimYH, Park BS, Bhatia SK, Seo HM, Jeon JM, Kim HJ, Yi DH, Lee JH, Choi KY, Park HY, Kim YG, YangYH (2014): Production of Rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus* from Glycerol-Based Media Optimized by Systemic Methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10): 1319-1326.

Kocić-Tanackov S, Dimić G (2013): Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane, *Hemijska industrija*, 67 (4): 639–653.

Kojima I, Cheng YR, Mohan V, Demain AL (1995): Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 436-439.

Kontro M, Lignell U, Hirvonen MR, Nevalainen A (2005): pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 32-38.

Kou LP, Gaskins VL, Luo YG, Jurick WM (2014): First Report of *Fusarium avenaceum* Causing Postharvest Decay of 'Gala' Apple Fruit in the United States. *Plant Disease*, 98 (5): 690.2 - 690.2.

Kumar SA, Chhatpar HS (2011): Combined use of *Streptomyces* sp. A6 and chemical fungicides against *Fusarium* wilt of *Cajanus cajan* may reduce the dosage of fungicides required in the field. *Crop Protect*, 30:770–775.

Kumari KK, Ponmurugan P, Kannan N (2006): Isolation and Characterization of *Streptomyces* sp. From Soil Samples for Secondary Metabolite Production. *Biotechnology*, 5: 478-480.

Kyu-Sang H, Hyun UK, Pep C, Bernhard P, Sang YL (2014): Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 32: 255–268.

Labeda DP (2011): Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 2525-2531.

Lazić Ž (2004): Design of Experiments in Chemical Engineering: a practical guide. Moristown, USA.

Lee MS, Kojima I, Demain AL (1997): Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 83–86.

Li WJ, Zhang LP, Xu P, Cui XL, Lu ZT, Xu LH, Jiang CL (2002): *Streptomyces beijiangensis* sp. nov., a psychrotolerant actinomycete isolated from soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1695-1699.

Liang J, Xu Z, Liu T, Lin J, Cen P (2008): Effects of cultivation conditions on the production of natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 145-150.

Magazin N, Keserović Z, Milić B, Dorić M, Gošić J (2013): Berba i čuvanje plodova jabuke iz integralne proizvodnje. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Mangamuri UK, Muvva V, Poda S, Agasar D (2014): Optimization of Process Parameters for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces tritolerans* DAS 165T. *British Microbiology Research Journal*, 4(4): 428-442.

Martín FJ (2004): Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *Journal of Bacteriology*, 186 (16): 5197–5201.

Martin J (2004): Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *Journal of Bacteriology*, 186 (16): 5197–5201.

Martins RA, Guimaraes LM, Pamboukian CR, Tonso A, Facciotti MCR, Schmidell W (2004): The effect of Dissolved Oxygen Concentration Control on Cell Growth and Antibiotic Retamycin Production in *Streptomyces olindensis* So20 Fermentations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21 (2): 185-192.

Mayers RH, Montgomery DC (2002): Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments (2<sup>nd</sup>ed.). Wiley - Interscience.

Mehling A, Wehmeier UF and Piepersberg W (1995): Nucleotide sequences of *streptomyces* 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for *streptomyces* using PCR. *Microbiology*, 141: 2139-2147.

Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W (1995): Nucleotide sequences of *streptomyces* 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for *streptomyces* using PCR. *Chemische Microbiology*, 141: 2139-2147.

Miličević T, Kaliterna J (2014): Biološko suzbijanje bolesti kao dio integrirane zaštite bilja, *Glasil o biljne zaštite*, 14 (5): 410-415.

Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W (2002): Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5005-5011.

Mitrović I, Grahovac J, Dodić J, Grahovac M, Dodić S, Vučurović D, Vlajkov V (2017): Effect of agitation rate on the production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygrosopicus* in a lab-scale bioreactor. *Acta Periodica Technologica*, 48: 231-244.

Mitrović I, Grahovac J, Dodić J, Grahovac M, Jokić A, Vučurović D, Dodić S (2017): Production of compounds effective against *Fusarium* spp. by *Streptomyces hygrosopicus*. *Proceedings of the 8th PSU -UNS International Conference on Engineering and Technology, ICET-2017*, 8. -10. June 2017, Novi Sad, Serbia, paper no. T2-1.5, pp. 1-4.

Mojićević M, Grahovac J, Petković M, Vučković I, Dodić J, Dodić S, Vojnović S (2017): Production of nigericin and niphimycin by soil isolate *Streptomyces* sp. MS1: Anti-Candida bioassay guided response surface methodology for the optimized culture medium. *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology*, 15(1): 1-16.

Mojović Lj (2008): *Farmaceutska biotehnologija*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

Montgomery DC (2005): *Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Nelson EP, Dignani MC, Anaissie JE (1994): Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4): 479-504.

Nett M, Ikeda H, Moore BS (2009): Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26: 1362–1384.

Nigam VK, Khandelwal AK, Agarwal A, Mohan MK, Vidyarthi AS (2012): Production of a Thermostable Nitrilase in a Lab Scale Stirred Tank Bioreactor. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 4: 81-90.

Nucci M, Anaissie E (2007): *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (4): 695-704.

Nunes C (2012): Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 181-196.

Obradović A, Radivojević D, Vajgand D, Rekanović E (2013): Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuka. Institut za primenjene nauke u poljoprivredi, Beograd.

Okada S, Iwamatu S (1997): Scale-up Production of Milbemycin by *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus* with Control of Internal Pressure, Temperature, Aeration and Agitation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 70: 179-187.

Olano C, Lombo F, Mendez C, Salas JA (2008): Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 10: 281–292.

Olmos E, Mehmood N, Haj Husein L, Goergen JL, Fick M, Delaunay S, (2013): Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36:259-272.

Ortiz SCA, Hokka CO, Badino AC (2007): Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1071–1077.

Pathom-Aree W, Stach JE, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M (2006): Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10: 181-189.

Paul EL, Atiemo Obeng VA, Kresta SM (2004): *Handbook of Industrial Mixing. Science and Practice*, John Wiley&Sons, Inc. New Jersey, Canada.

Pavon MA, Gonzalez I, Pegels N, Martin R, Garcia T (2010): PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control*, 21: 1745–1756.

Peji D (2003): *Industrijska mikrobiologija*. Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Perez-Vicente L, Dita AM, Martinez de la Parte E (2014): Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4). Technical Manual, Food and agriculture organization of the United Nations.

Petrović M, Sekulić J (2017): Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji. *Biljni lekar*, 45: 1-2, 153-170.

Piret JM, Demain AL (1988): Actinomycetes in Biotechnology: An Overview. In: Actinomycetes in Biotechnology (Ed. Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M.), 461-482.

Popov S (2000): Osnovi biohemijskog inženjerstva, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Portera MA, Jonesb AM (2003): Variability in soy flour composition. Journal of the American Oil Chemists' Society, 80: 557-562.

Pose GN, Ludemann V, Fernandez D, Segura JA, Pinto VF (2010): *Alternaria* species associated with 'moldy heart' on peaches in Argentina. Tropical Plant Pathology, 35: 174-177.

Prapagdee B, Akrapikulchart U, Mongkolsuk S (2008): Potential of soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchid. Journal of Biological Sciences, 8(7): 1187-1192.

Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S (2008a): Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. International Journal of Biological Sciences, 4: 330-337.

Priya E, Thenmozhi R, Nagasathya A, Praveen Kumar D, Thajuddin N, Muralitharan G (2014): Antagonistic potential of *Streptomyces flavomacrosporus* GACMPT-57 against plant pathogens. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 4 (1): 68-73.

Pscheidt JW, Ocamb CM (2013): Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook, 5: 27-29.

Rao AR, Patel AK, Kumar B (2010): Power characteristics of surface aerators. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85: 805-813.

Reungsang A, Sittijundac S, Angelidaki I (2013): Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. International journal of hydrogen energy, 38: 1813-1825.

Ripa FA, Nikkon F, Zaman S, Khondkar P (2009): Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. Mycobiology, 37(3): 211-214.

Ristić D, Aćimović M, Trkulja N (2014): Morfološka i molekularna identifikacija izolata *Alternaria alternata* - patogena plodova kima u Srbiji. Plant Protection, 65 (4): 163-169.

Ristić TD (2012): Karakterizacija vrsta roda *Fusarium* patogena sirka [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] u Srbiji i utvrđivanje osetljivosti genotipova. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Roberts WJ (1924): Morphological characters of *Alternaria mali* Roberts. Journal of Agricultural Research, 27 (9): 699-708.

Rotem J (1998): The genus of *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. The American Phytopathological Society, USA.

Rotondo F, Collina M, Brunelli A, Pryor BM (2012): Comparison of *Alternaria* spp. collected in Italy from apple with *A. mali* and other AMtoxin producing strains. *Phytopathology*, 102: 1130-1142.

Schrader KK, Blevins WT (2001): Effect of carbon source, phosphorus concentration, and several micronutrients on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26: 241-247.

Segy I (1983): *Methods of Soil Microbiology*. Moskva, Mir.

Seifert KA, Levesque CA (2004): Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 449–471.

Ser HL, Fei JW, Chaiyakunapruk N, Jacob SA (2016): Fermentation Conditions that Affect Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review, *Frontiers in Microbiology*, 7: 522.

Serdani M, Kang JC, Andersen B, Crous WP (2002): Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106 (5): 561–569.

Sever Z, Ivić D, Kos T, Miličević T. (2012): Identification of *Fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63: 463-470.

Shimizu M, Yazawa S, Ushijama Y (2009): A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *Journal of General Plant Pathology*, 75: 27-36.

Shioya S, Morikawa M, Kajihara Y, Shimizu H (1999): Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 164-169.

Shtienberg D (2012): Effects of host physiology on the development of core rot, caused by *Alternaria alternata*, in red delicious apples. *Phytopathology*, 102: 769–778.

Siddique S, Syed Q, Nelofer R, Adnan A, Mansoor H, Qureshi FA (2014): Avermectin B1b Production Optimization from *Streptomyces avermitilis* 41445 UV 45(m)3 Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(3): 371-378.

Simmons EG (2007). *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

- Singh LS, Mazumder S, Bora TC (2009): Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale*, 19: 225–233.
- Singh N, Rai V (2012): Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* mtcc 10792 from soil of Chhattisgarh. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (4): 94-101.
- Singh V, Deverall BJ (1984): *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*, 83 (3): 487-490.
- Singh V, Tripathi CKM, Bihari V (2008): Production, optimization and purification of an antifungal compound from *Streptomyces capoamus* MTCC 8123. *Medicinal Chemistry Research*, 17: 94-102.
- Snowdon A (1990): *A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits & Vegetables*. Wolfe Scientific Ltd, London.
- Sochocka M, Boratynski J (2011): Osmoregulation-an important parameter of bacterial growth. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 65: 714-724.
- Sorensen JL, Phipps RK, Nielsen KF, Schroers H.J, Frank J, Thrane U (2009): Analysis of *Fusarium avenaceum* Metabolites Produced during Wet Apple Core Rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1632–1639.
- Sousa MFVQ, Lopes CE, Pereira N (2002): Development of a bioprocess for the production of actinomycin-D. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19 (3): 277-285.
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ (1995): *Principles of Fermentation Technology*. Second Edition, Elsevier Science Lid, Oxford, UK.
- Stanković N (2012): Izolacija i karakterizacija bioaktivnih sekundarnih metabolita iz odabranih sojeva roda *Streptomyces*. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Beograd, 2012.
- Subramaniam G, Arumugam S, Rajendran V (2016): *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*. Singapore Springer, Singapore.
- Tadijan I, Grahovac J, Dodić J, Grahovac M, Dodić S (2016): Effect of Cultivation Time on Production of Antifungal Metabolite(s) by *Streptomyces hygrosopicus* in Laboratory-Scale Bioreactor. *Journal of Phytopathology*, 164: 310–317.
- Taralova HE, Schlecht J, Barnard K, Pryor MB (2011): Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal Biology*, 115: 1163-1173.
- Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K (2003): Optimization of Aeration and Agitation Rates to Improve Cellulase-Free Xylanase Production by Thermotolerant

*Streptomyces* sp. Ab 106 and Repeated Fed-Batch Cultivation Using Agricultural Waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (3): 298-301.

Tewoldemedhin TY, Mazzola M, Botha JW, Spies CFJ, McLeod A (2011): Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 215–229.

Thomma B (2003): *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4 (4): 226-236.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997): The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24): 4876–4882.

Tian XP, Xu Y, Zhang J, Li J, Chen Z, Kim CJ, Li WJ, Zhang CS, Zhang S (2012): *Streptomyces oceani* sp. nov., a new obligate marine actinomycete isolated from a deep-sea sample of seep authigenic carbonate nodule in South China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102: 335-343.

Tresner HD, Backus EJ (1956): A Broadened Concept of the Characteristics of *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology*, 4: 243-250.

Vignutelli A, Hilber-Bodmer M, Hilber UW (2002): Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 106: 329-335.

Wallace GI, Rhymer I (1945): Studies on mode of action of streptomycin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 60: 127-131.

Wang PH, Chen YS, Lin MJ, Tsou YJ, Ko WH (2010): Severe decline of wax apple trees caused by *Fusarium solani* in northern Taiwan. *Botanical Studies*, 51: 75-80.

Wenneker M, Pham KTK, Lemmers MEC, de Boer FA, van der Lans AM, van Leeuwen PJ, Hollinger TC, Thomma BPHJ (2016): First Report of *Fusarium avenaceum* Causing Wet Core Rot of 'Elstar' Apples in the Netherlands. *Plant Disease*, 100 (7): 1501.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR Protocols*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ (1983): Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology*, 129: 1743-1813.

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW (2013): *Alternaria* redefined, *Studies in Mycology*, 75: 171–212.



Wu JY, Huang JW, Shih HD, Lin WC, Liu YC (2008): Optimization of cultivation conditions for fungichromin production from *Streptomyces padanus* PMS-702. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39: 67-73.

Xia J, Wang G, Lin J, Wang Y, Chu J, Zhuang Y, Zhang S (2015): Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, DOI 10.1007/10\_2014\_293.

Yen HW, Hsiao HP, Chen L.J (2013): The enhancement of rapamycin production using *Streptomyces hygroscopicus* through a simple pH-shifted control. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44: 743-747.

Yen HW, Li YL (2014): The effects of viscosity and aeration rate on rapamycin production in an airlift bioreactor by using *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45: 1149–1153.

Yen HW. Hsiao HP (2013): Effects of dissolved oxygen level on rapamycin production by pellet-form of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116 (3): 366-370.

Yin P, Wang YH, Zhang SL, Chu J, Zhuang YP, Chen N, Li XF, Wu YB (2008): Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39: 609–615.

Yli-Mattila T, Paavenen-Huhtala S, Bulat AS, Alekhina AI, Nirenberg IH (2002): Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex – a polyphasic approach. *Mycological Research*, 106 (6): 655–669.

Zacky FA, Ting ASY (2013): Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4. *Biological Control*, 66: 204–208.

Zebboudj N, Yezli W, Hamini-Kadar N, Kihal M, Eddine Henni J (2014): Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolated from diseased date palm in South Algeria. *International Journal of Biosciences*, 5 (9): 99-106.

Živković S, Stojanović S, Ivanović Ž, Gavrilović V, Popović T, Balaž J (2010): Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62 (3): 611-623.

<http://postharvest.tfrec.wsu.edu/marketdiseases/alternaria.html>

<http://vocarskikrug.blogspot.rs/2015/05/alternarija-na-jabukama-alternaria-mali.html>

[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Fusarium](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

<http://www.tuat.ac.jp/~chemreg/Eng/bioregchem.html>

[https://www.eppo.int/QUARANTINE/data\\_sheets/fungi/ALTEMA\\_ds.pdf](https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/fungi/ALTEMA_ds.pdf)

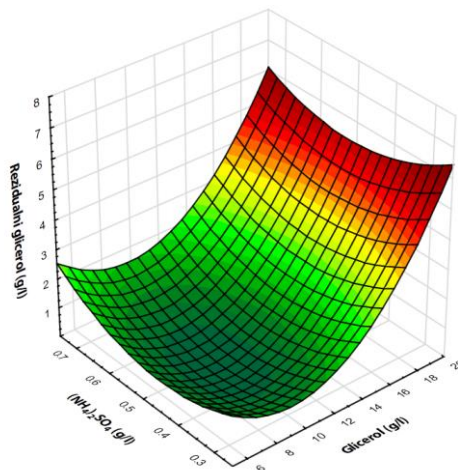
[www.fao.stat.org](http://www.fao.stat.org)

[www.microbiologybytes.com](http://www.microbiologybytes.com)

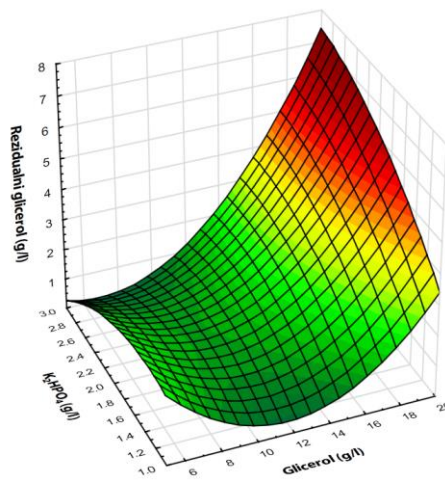
## 8. PRILOZI

---

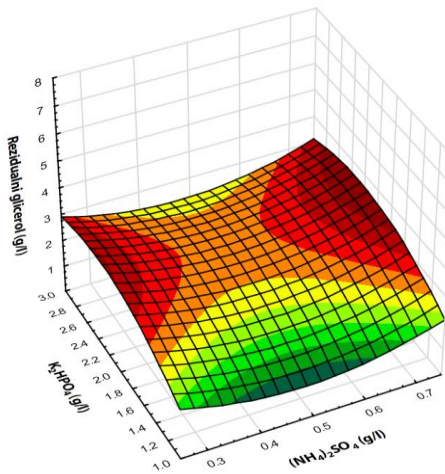
## 8.1 PRILOG 1



a),

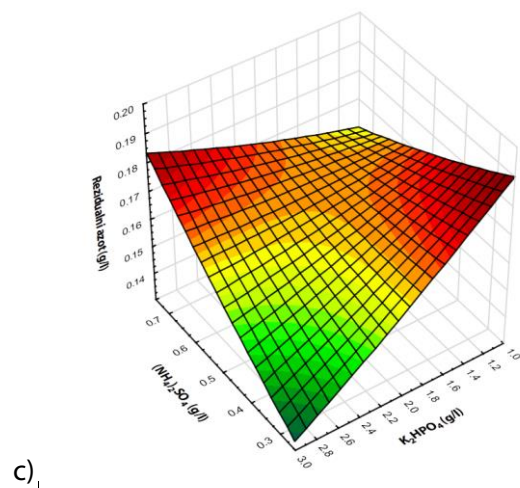
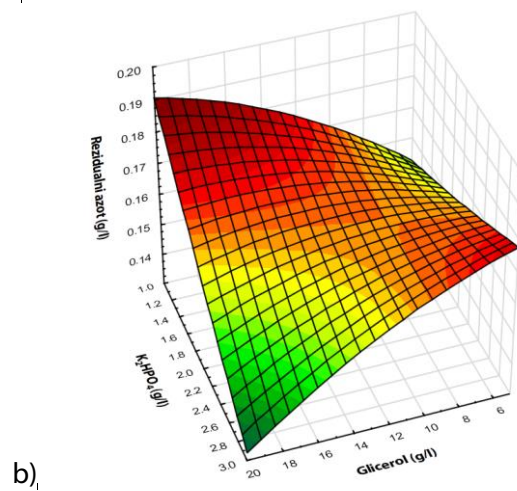
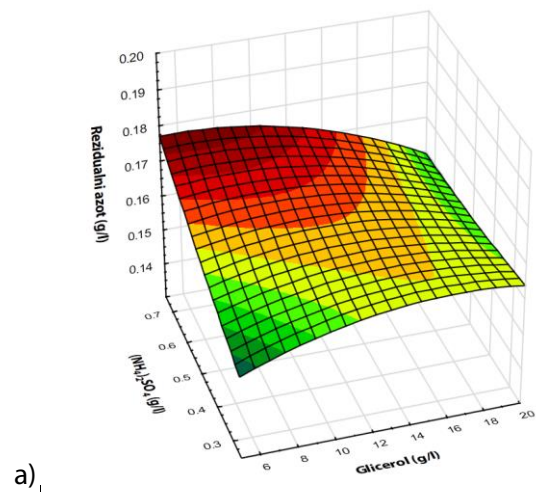


b)

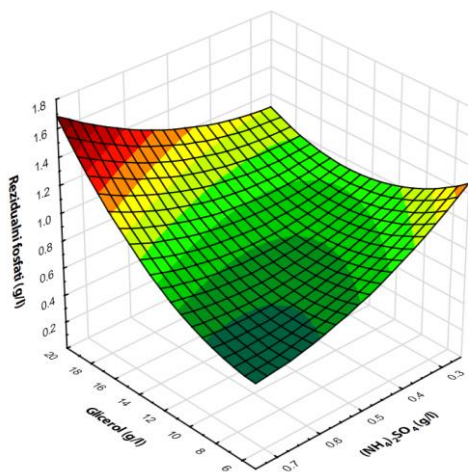


c),

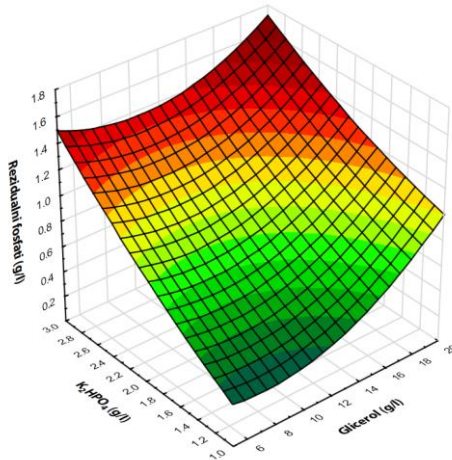
Slika 8.1. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog glicerola pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
a)  $K_2HPO_4$ ; b)  $(NH_4)_2SO_4$ ; c) glicerol



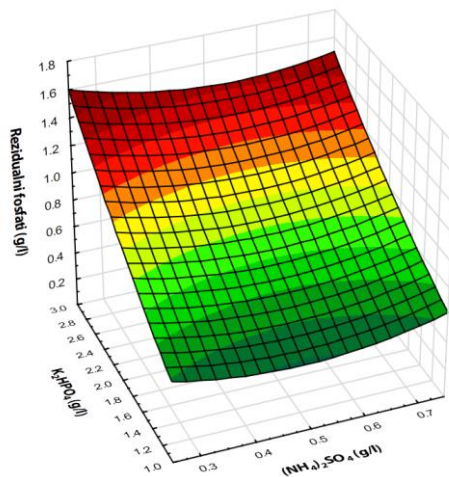
Slika 8.2. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog azota pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
 a)  $K_2HPO_4$ ; b)  $(NH_4)_2SO_4$ ; c) glicerol



a),



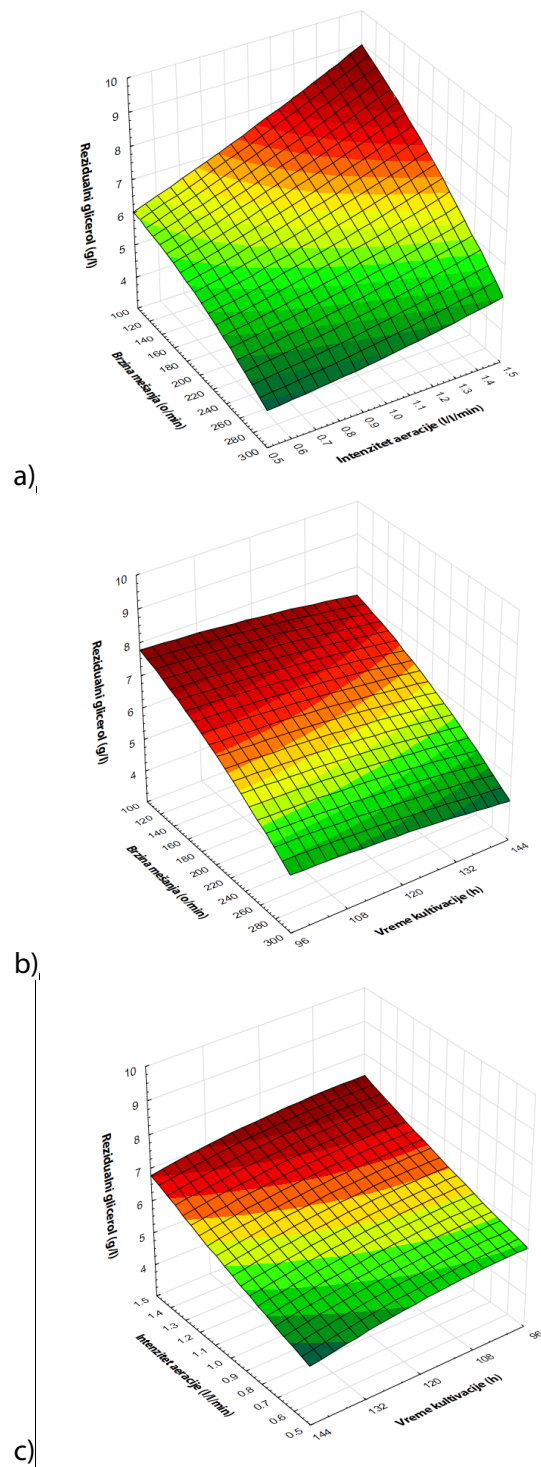
b),



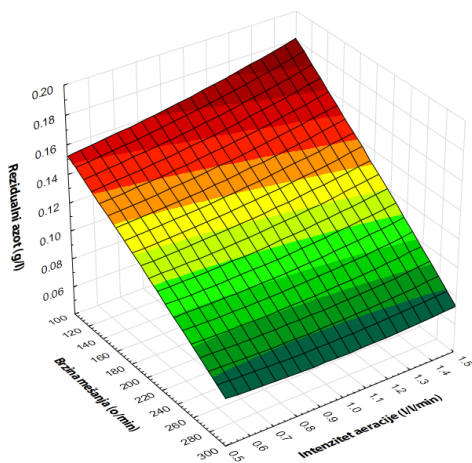
c),

Slika 8.3. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog fosfata pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
 a)  $K_2HPO_4$ ; b)  $(NH_4)_2SO_4$ ; c) glicerol

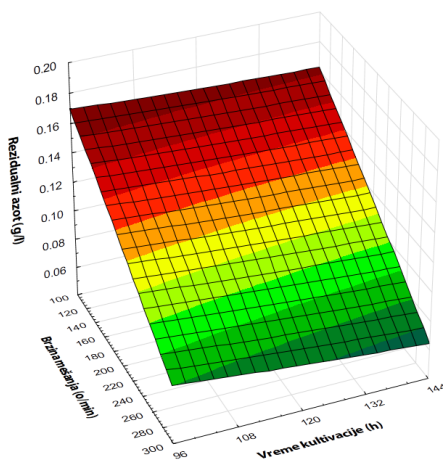
## 8.2. PRILOG 2



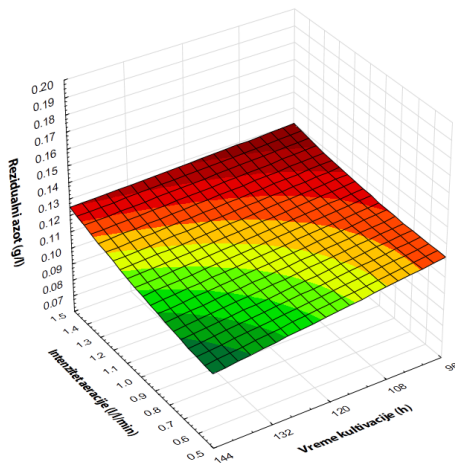
Slika 8.4. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog glicerola pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja



a),



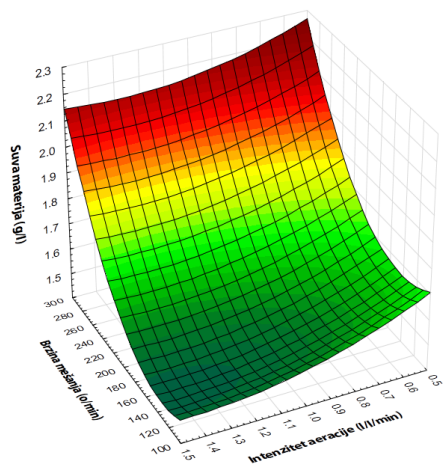
b),



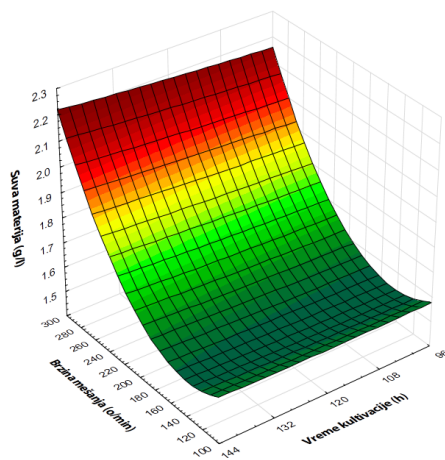
c),

Slika 8.5. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog azota pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:  
 a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja

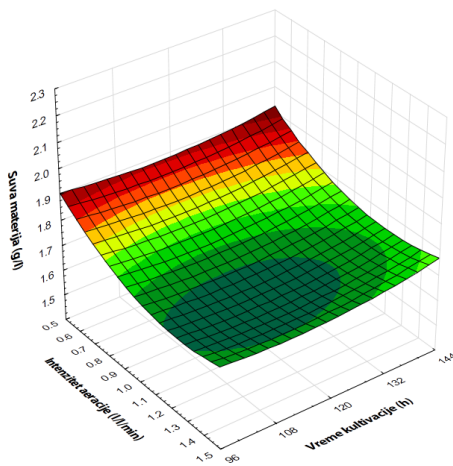




a),



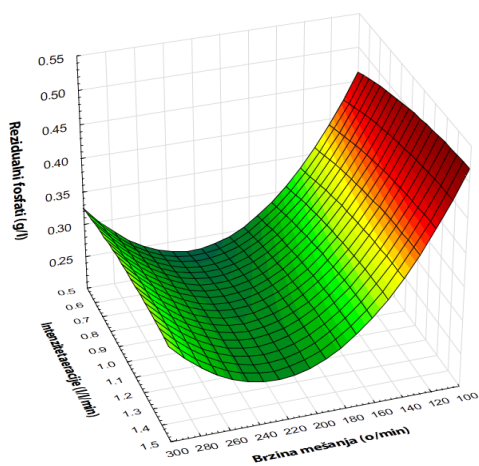
b),



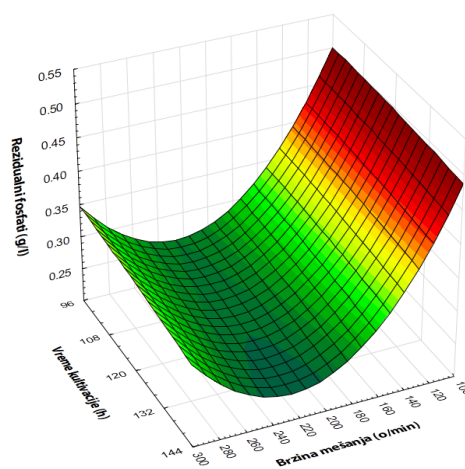
c),

Slika 8.6. Uticaj interakcije dva faktora na količinu suve materije pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

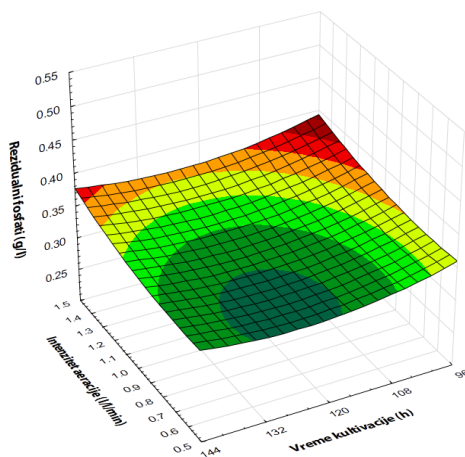
a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja



a),



b),



c),

Slika 8.7. Uticaj interakcije dva faktora na količinu rezidualnog fosfata pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora:

a) vreme kultivacije; b) intenzitet aeracije; c) brzina mešanja

## **KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

---

**Redni broj:**  
RBR

**Identifikacioni broj:**  
IBR

**Tip dokumentacije:** monografska dokumentacija  
TD

**Tip zapisa:** tekstualni štampani material  
TZ

**Vrsta rada:** doktorska disertacija  
VR

**Autor:** Ivana Ž. Mitrović  
AU

**Mentor:** Dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad  
MN

**Naslov rada:** Optimizacija biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygrosopicus*  
NR

**Jezik publikacije:** srpski (latinica)  
JP

**Jezik izvoda:** srpski/engleski  
JI

**Zemlja publikovanja:** Srbija  
ZP

**Uže geografsko područje:** Vojvodina  
UGP

**Godina:** 2018  
GO

**Izdavač:** autorski reprint  
IZ

**Mesto i adresa:** Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
MA

**Fizički opis rada:** broj poglavlja 8, strana 148, tabela 34, slika 38, literaturnih navoda 197  
FO

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo  
NO

<b>Naučna disciplina:</b> ND	Biotehnologija
<b>Predmetna odrednica, ključne reči:</b> PO	biotehnološka proizvodnja, <i>Streptomyces hygrosopicus</i> , skladišni patogeni jabuke, antagonisti, optimizacija
<b>UDK:</b>	579.86/.87:632.937.1]:634.11(043.3)
<b>Čuva se u:</b> ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija
<b>Važna napomena:</b> VN	nema
<b>Izvod:</b> IZ	<p>Plodovi jabuke su tokom čitave godine prisutni u ishrani beba, dece i odraslih ljudi zbog čega je kvalitet i zdravstvena bezbednost ovih namirnica od izuzetnog značaja. Veliki broj fitopatogenih gljiva su prouzrokovaci bolesti jabuka međutim, među značajnim prouzrokovacima bolesti jabuka u skladištima spominju se gljive iz rodova <i>Alternaria</i> i <i>Fusarium</i>. Smatra se da su zdravstveno bezbedni plodovi jabuke pre svega zdravi plodovi, bez prisustva fitopatogenih gljiva i bez ostataka fungicida. Sve veća briga oko primene sintetičkih fungicida zbog njihove toksičnosti, razvoja rezistentnosti patogena na fungicide i štetnih efekata na životnu sredinu i zdravlje ljudi, doveli su do potrebe za pronalaženjem alternative hemijske zaštiti, a jedno od mogućih se ogleda upravo u primeni biotehnološkim postupkom proizvedenih agenasa. Budući da su visoki troškovi biotehnološke proizvodnje osnovna prepreka za širu primenu ovih agenasa, optimizacija uslova izvođenja biosinteze predstavlja najvažniji korak ka njenom prevazilaženju. Stoga je kao cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije definisana optimizacija biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke primenom <i>Streptomyces hygrosopicus</i> na nivou laboratorijskog bioreaktora u pogledu odabira izvora ugljenika i azota i količina izvora ugljenika, azota i fosfora u hranljivoj podlozi za biosintezu željenih antagonističkih agenasa, kao i parametara biosinteze sa posebnim osvrtom na intenzitet primenjene aeracije i mešanja. Analizom dobijenih rezultata zaključeno je da se podloga za kultivaciju <i>S. hygrosopicus</i> koja je sadržala glicerol i pored već prisutnog azota u podlozi nije sadržala dodatni izvor azota, pokazala kao najpogodnija za produkciju željenih antagonističkih agenasa efikasnih protiv izolata vrsta <i>A. alternata</i> i <i>F. avenaceum</i>. Rezultati optimizacije sastava hranljive podloge ukazuju da se primenom definisanih optimalnih vrednosti ispitivanih faktora, koje su: sadržaj glicerola od 20 g/l, sadržaj <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math> od 0,25 g/l i sadržaj <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> od 1,41 g/l u podlozi za biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke</p>

primenom *S. hygrosopicus*, na osnovu definisanih matematičkih modela predviđaju sledeće vrednosti parametara toka i parametara uspešnosti biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke: rezidualni glicerol od 5,3418 g/l; rezidualni azot od 0,193 g/l; rezidualni fosfati od 0,8601 g/l; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 od 28,22 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 od 36,86 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 od 25,54 mm i prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13 od 26,78 mm. Rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja različitog intenziteta aeracije i brzine mešanja na biosintezu antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *S. hygrosopicus* u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 3 l ukazuju da se primenom definisanih optimalnih vrednosti ispitivanih faktora, brzine mešanja od 100 o/min, intenziteta aeracije od 1,2 l/l/min i pri trajanju kultivacije od 96 h na osnovu definisanih matematičkih modela predviđaju sledeće vrednosti parametara toka i parametara uspešnosti biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke: rezidualni glicerol od 8,2645 g/l; rezidualni azot od 0,1723 g/l; rezidualni fosfati od 0,5167 g/l; suva materija 1,5023 g/l; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* KA10 od 62,62 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *A. alternata* T1Jg3 od 61,09 mm; prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA12 od 45,55 mm i prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *F. avenaceum* KA13 od 43,02 mm. Validnost dobijenih rezultata potvrđena je izvođenjem biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke na podlozi optimalnog sastava i primenom optimalnih procesnih parametara u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 7l, a efikasnost produkovanih antagonističkih agenasa efikasnih na izolate *A. alternata* (KA10 i T1Jg3) i *F. avenaceum* (KA12 i KA13) potvrđena je i u in planta ogleđima. Ostavreni rezultati optimizacije biosinteze antagonista skladišnih patogena jabuke primenom *Streptomyces hygrosopicus* na nivou laboratorijskog bioreaktora predstavljaju osnovu za dalje uvećanje razmera do industrijskih, što je ključni korak ka potencijalnoj industrijalizaciji predloženog proizvodnog postupka.

Datum prihvatanja teme: 22.6.2017.

DP:

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

**Predsjednik:** Dr Jelena Dodić, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad  
**Mentor:** Dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad  
**Član:** Dr Dragoljub Cvetković, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad  
**Član:** Dr Mila Grahovac, docent, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

## 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:** Ivana Ž. Mitrović  
AU

**Menthor:** Jovana Grahovac, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad  
MN

**Title:** Optimization of antagonists of storage apple pathogens  
biosynthesis by *Streptomyces hygrosopicus*  
TI

**Language of text:** Serbian (Latinic)  
LT

**Language of abstract:** Serbian/English  
LA

**Country of publication:** Serbia  
CP

**Locality of publication:** Vojvodina  
LP

**Publication year:** 2018  
PY

**Publisher:** Author's reprint  
PU

**Publication place:** Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1  
PP

**Physical description:** chapters 8, pages 148, tables 34, figures 38,  
references 197  
PD

**Scientific field:** Technological Engineering  
**SF**

**Scientific discipline:** Biotechnology  
**SD**

**Subject, Key words:** Biotechnological production, *Streptomyces hygrosopicus*, storage  
**SKW** apple pathogens, antagonists, optimization

**UDK:** 579.86/.87:632.937.1]:634.11(043.3)

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

**Note:** none  
**N**

**Abstract:**  
**AB** Apple fruits are available on the market all year round and their safety is of great importance for the consumers. Unfortunately, many phytopathogenic fungi can cause apple diseases but fungi from the genera *Alternaria* and *Fusarium* are listed among important storage pathogens of apple fruits. It is considered that health-safe apple fruits are primarily healthy fruits, without the presence of phytopathogenic fungi and without the remains of fungicides. Excessive use of pesticides in modern agriculture, including those used for control of fungal phytopathogens, has led to several problems related to pollution, environmental degradation and emergence of resistant strains. Biological control of plant pathogens by means of microorganisms is considered as an attractive alternative to chemical-based treatments, with minimal impact on the environment. The main lack of biotechnology production of the antifungal agents are the high costs, so the optimization of the biosynthesis conditions is the most important step towards its overcoming. Therefore, the aim of this research is to optimize the medium composition and process conditions (agitation and aeration rate) of the antagonists of storage apple pathogens biosynthesis by *Streptomyces hygrosopicus* in laboratory-scale bioreactor. Based on the obtained results, it can be concluded that the *S. hygrosopicus* cultivation medium containing glycerol as a carbon source, with no additional nitrogen source, proved to be the most suitable for the production of the *A. alternate* and *F. avenaceum* antagonistic agents. The results of the optimization of medium for biosynthesis of the antagonists of storage apple pathogens using *S. hygrosopicus* indicated the following optimal values of the examined factors: the content of glycerol of 20 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> of 0.25 g/l and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> of 1.41 g/l. By applying the defined optimal values and using the appropriate mathematical models, the following responses are predicted: residual glycerol of 5.3418 g/l; residual nitrogen of 0.193 g/l;

residual phosphates of 0.8601 g/l; inhibition zone diameters of *A. alternata* KA10 of 28.22 mm; inhibition zone diameters of *A. alternata*T1Jg3 of 36.86 mm; inhibition zone diameters of *F. avenaceum* KA12 of 25.54 mm and inhibition zone diameters of *F. avenaceum* KA13 of 26.78 mm. Examining the effect of different agitation and aeration rate on the biosynthesis of antagonists of storage apple pathogens using *S. hygroscopicus* in a laboratory-scale bioreactor with total volume of 3 l, the following optimal values of the investigated factors are obtained: the agitation rate of 100 rpm, the aeration of 1.2 l/l/min and 96-hour as optimal time of cultivation. Bringing together the appropriate mathematical models and defined optimal values, the following responses are predicted: residual glycerol of 8.2645 g/l; residual nitrogen of 0.1723 g/l; residual phosphates of 0.5167 g/l; biomass content of 1.5023 g/l; inhibition zone diameters of *A. alternata* KA10 of 62.62 mm; inhibition zone diameters of *A. alternata*T1Jg3 of 61.09 mm; inhibition zone diameters of *F. avenaceum* KA12 of 45.55 mm and inhibition zone diameters of *F. avenaceum* KA13 of 43.02 mm. The validity of the results was confirmed by performing the biosynthesis of the antagonists of storage apple pathogens in the medium with optimal composition and the optimal process parameters in a laboratory-scale bioreactor with the total volume of 7l. The efficacy of produced antagonistic agents effective against *A. alternata* (KA10 and T1Jg3) and *F. avenaceum* (KA12 and KA13) isolates was confirmed *in vitro* and *in planta*. The results obtained within this research represents the basis for the further enlargement of the scale, which is a key step towards the potential industrialization of the proposed production process.

Accepted by the Scientific Board on: 22.6.2017.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board:

DB

<b>President:</b>	Jelena Dodić PhD, full professor, Faculty of Technology Novi Sad
<b>Menthor:</b>	Jovana Grahovac PhD, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad
<b>Member:</b>	Dragoljub Cvetković PhD, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad
<b>Member:</b>	Mila Grahovac PhD, assistant professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad