



UNIVERZITET U NIŠU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



**Jovan (Toplica) Ćirić**

**MIKROBIOLOŠKO ISKORIŠĆENJE  
OTPADNOG GLICEROLA IZ PROIZVODNJE  
BIODIZELA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2017



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



**Jovan (Toplica) Ćirić**

**THE MICROBIOLOGICAL UTILISATION OF  
WASTE GLYCEROL FROM BIODIESEL  
PRODUCTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2017.

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Славица Илић, ванредни професор, Технолошки факултет у  
Лесковцу, Универзитет у Нишу

Наслов:

Микробиолошко искоришћење отпадног глицерола из  
производње биодизела

Резиме:

Као споредни производ у процесу добијања биодизела настаје трохидроксилни алкохол глицерол који се може посматрати као сирова глицеринска фракција због саржаја нечистоћа. Тренутна истраживања широм света усмерена су на проучавању могућности термичке, хемијске и биолошке конверзије отпадног глицерола у различите производе.

Глицерол се може користити као главни извор угљеника хранљивих подлога за гајење микроорганизама у индустријским ферментацијама. У оквиру ове дисертације проучавана је могућност микробиолошког искоришћења отпадног глицерола, добијеног као споредног производа у производњи биодизела од сунцокретовог и репичиног уља, помоћу млечно киселинске бактерије *Enterococcus faecalis* МКЗ-10А, бактерије *Streptomyces hygroscopicus* СН-7 и слатководних микроалги.

Бактерија *E. faecalis* МКЗ-10А није продуковала значајну количину млечне киселине, а највиша продукција (14,64 mg/ml/d) остварена је гајењем у подлози која је садржала отпадни глицерол из производње биодизела од сунцокретовог уља. Зависно од састава подлоге утроши 21-37 % од расположиве количине глицерола.

Гајењем у подлогама са отпадним глицеролом, за разлику од подлога са глукозом, бактерија *S. hygroscopicus* СН-7 расте слабије и не продукује знатно више антибиотика. Међутим, додатком деривата изатина, као извора азота, продукција антибиотика се знатно повећава. Као најпогоднији звор азота за продукцију оба антибиотика, гајењем у подлогама са отпадним глицеролом, показао се изатин-3-хидразон, са којим су остварене највише концентрације хексаена Н-85 (196 µg/ml) и азаломицина В (75µg/ml).

Иzolовани сој алги, окарактерисан као припадник рода *Chlorococcum*, добро расте и троши сву расположиву количину чистог и отпадног глицерола добијеног у производњи биодизела од сунцокретовог уља, као и значајну количину глицерола репичиног уља, (61 %), али у односу на остале изоловане сојеве алги, продукује најмање уља у свим подлогама (15-23 % у сувој биомаси). Без обзира на слабији раст и потрошњу глицерола, сојеви *Chlorella* и *Scenedesmus* продукују највише уља (27-35 % у сувој биомаси).

Генерални закључак ове дисертације је да је отпадни глицерол из производње биодизела од репичиног уља мање погодан извор угљеника за гајење бактерија *E. faecalis* МК3-10А и *S. hygroscopicus* СН-7 због нечистоћа које садржи. Због тога, потребно је пречишћавање пре примене, осим у случају продукција антибиотика азаломицина В помоћу бактерије *S. hygroscopicus* СН-7 уз додатак деривата изатина као извор азота, као и у случају продукције уља помоћу слатководних једноћелијских алги. Насупрот томе, отпадни глицерол сунцокретовог уља може се користити без пречишћавања јер је за продукцију млечне киселине, антибиотика хексаена Н-85 и продукцију уља алги био ефикаснији од чистог глицерола као извора угљеника.

Научна област:  
Ужа научна  
област:

Технолошко инжењерство

Прехрамбене технологије и биотехнологија

Кључне речи:

отпадни глицерол, *Enterococcus faecalis* МК3-10А, *Streptomyces hygroscopicus* СН-7, слатководне микроалге

УДК:

579:547.426.1:662.756.3

CERIF  
класификација:

T490

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Dr Slavica Ilić, Associate Professor, Faculty of Technology,  
Leskovac, University of Niš

Title:

THE MICROBIOLOGICAL UTILISATION OF WASTE  
GLYCEROL FROM BIODIESEL PRODUCTION

Abstract:

Three-hydroxyl alcohol glycerol, obtained during the biodiesel production, can be observed as a crude glycerol fraction because of the impurity content. Current researches around the world are aimed at studying the possibilities of converting waste glycerol into various products.

Glycerol can be used as the main source of carbon in media for industrial fermentations. This dissertation was studying the possibility of microbial utilization of waste glycerol, obtained as a by-product in the production of biodiesel from sunflower and rapeseed oil, using *Enterococcus faecalis* MK3-10A lactic acid bacteria, *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 bacteria and freshwater microalgae.

Bacteria *E. faecalis* MK3-10A did not produce a significant amount of lactic acid. The highest production of 14,64 mg/ml/d was achieved in medium containing waste glycerol obtained in biodiesel production from sunflower oil. Depending on the medium, consumption of glycerol was 21-37 %.

Cultivating in media containing waste glycerol, as opposed to media with glucose, bacteria *S. hygroscopicus* CH-7 showed lower growth and did not produce significantly higher amounts of antibiotics. However, addition of isatin derivatives, as a nitrogen source, significantly increased the production of antibiotics. Isatin-3-hydrazone shows the best influence on the antibiotics production, wherein the maximum concentration of hexaene H-85 (196 µg/ml) and azalomycine B (75µg/ml) was obtained.

An isolated strain of algae, characterized as a member of genus *Chlorococcum*, grows well and consume all of available quantity of clean and waste glycerol from sunflower oil, as well as significant amount of glycerol from rapeseed oil (61 %), but in comparison to other isolated strains of algae it produces the least amount of microbial oil (15-23 %). Regardless of weaker growth and consumption of glycerol, *Chlorella* and *Scenedesmus* strains produce the most microbial oil (27-35 %).

The general conclusion of this thesis is that the waste glycerol obtained in biodiesel production from rapeseed oil is less suitable, as a carbon source, for cultivation of bacteria *E. faecalis* MK3-10A, because of impurities it contains. Therefore, it is necessary to purify it before using, except in the case of antibiotic azalomycine B production by *S.hygroscopicus* CH-7 with addition of isatin derivatives, as well as microbial oil production by freshwater algae. As opposed to that, waste glycerol from sunflower oil can be used without purification, because it was more efficient in production of lactic acid, antibiotic hexane and algae oil than the pure glycerol.

Scientific  
Field:

Technological engineering

Scientific  
Discipline:

Food technology and biotechnology

Key Words:

waste glycerol, *Enterococcus faecalis* MK3-10A, *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, freshwater microalgae

UDC:

579:547.426.1:662.756.3

CERIF  
Classification:

T490

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: „Nanostrukturni funkcijalni i kompozitni materijali u katalitičkim i sorpcionim procesima” (III 45001).

## SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA

BBM – „Bold’s Basal Medium” hranljiva podloga

$C_{max}$  – Maksimalna koncentracija

DHA - Dihidroksiaceton

DHK - Dokozaheksaenoinska kiselina

EPA - Eikozapentenska kiselina

MRS – „de Man, Rogosa, Sharpe” hranljiva podloga

OD – „Optical density” (optička gustina)

OSP – Osnovna podloga sa sojom

PHA - polihidroksialkanoat

PHB - poli-3-hidroksibutirat

$q_p$  – specifična brzina stvaranja proizvoda (mg/g/d)

SBM – Suva biomasa

$X_{max}$  – Maksimalna koncentracija biomase

$Y_{P/S}^{MK}$  – Prinos mlečne kiseline po jedinici utrošenog supstrata (mg/ml/d)

$Y_{P/X}$  – Prinos proizvoda po jedinici biomase (mg/g)

$\Delta_{gluk}$  – Promena koncentracije glukoze (mg/ml)

$\Delta_{glic}$  – Promena koncentracije glicerola (mg/ml)

1,3 PD - 1,3-propandiol



## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Teorijski deo .....	6
2.1 Biodizel i sirovine za dobijanje.....	6
2.1.1 Glicerol kao sporedni proizvod u proizvodnji biodizela .....	7
2.1.2 Fizička i hemijska svojstva glicerola.....	8
2.2 Dobijanje glicerola .....	10
2.2.1 Reakcije transesterifikacije.....	10
2.2.2 Kiselo katalizovana transesterifikacija .....	13
2.2.3 Bazno katalizovana transesterifikacija .....	14
2.2.4 Enzimski katalizovana transesterifikacija .....	15
2.2.5 Odvajanje biodizela i glicerola .....	18
2.2.6 Saponifikacija .....	18
2.2.7 Hidroliza .....	19
2.2.8 Prečišćavanje otpadnog glicerola .....	20
2.3 Upotreba (čistog) glicerola.....	23
2.3.1. Primena glicerola u industriji .....	23
2.3.2. Hemijska konverzija glicerola do 1,2-propandiola i akroleina.....	25
2.3.3 Hemijska konverzija glicerola do vodonika .....	26
2.4 Otpadni glicerol kao sirovina za bioprocese .....	27
2.4.1 1,3 – propandiol .....	31

2.4.2 Dihidroksiaceton.....	33
2.4.3 Limunska kiselina.....	34
2.4.4 Čilibarna kiselina.....	34
2.4.5 Glicerolska kiselina .....	35
2.4.6 Propionska kiselina i trehaloza .....	35
2.4.7 Otpadni glicerol kao sirovina za dobijanje mlačne kiseline .....	36
2.4.8 Ksantan .....	38
2.4.9 <i>n</i> – Butanol.....	38
2.4.10 Etanol.....	39
2.4.11 Vodonik .....	40
2.4.12 Biopolimeri.....	40
2.4.13 Mikrobno ulje .....	42
2.4.14 Otpadni glicerol kao dodatak stočnoj hrani.....	42
2.4.15 Otpadni glicerol kao sirovina za dobijanje antibiotika.....	43
2.4.16 Otpadni glicerol kao izvor ugljenika za gajenje mikroalgi.....	45
3. MATERIJAL I METODE .....	48
3.1 Hemikalije.....	48
3.2 Mikrororganizmi.....	50
3.2.1 Bakterija <i>Enterococcus faecalis</i> MK3-10A.....	50
3.2.2 Bakterija <i>Streptomyces hygrosopicus</i> CH-7 .....	50
3.2.3 Jednoćelijske alge izolovane iz slatkovodnih bara .....	50
3.3 Hranljive podloge.....	52
3.3.1 Osnovne podloge za gajenje korišćenih mikroorganizama .....	52
3.3.2 Podloge izmenjenog sastava.....	53

3. 4 Metode.....	54
3.4.1 Sinteza derivata izatina u otpadnom glicerolu.....	54
3.4.2 Izolacija mikroalgi iz uzoraka vode slatkovodnih bara .....	55
3.4.3 Izvođenje fermentacije sa sojem <i>Enterococcus faecalis</i> MK3-10A.....	55
3.4.4 Izvođenje fermentacija sa sojem <i>Streptomyces hygroscopicus</i> CH-7 .....	55
3.4.5 Gajenje mikroalgi u podlogama sa sa glicerolom .....	56
3.5 Analitičke metode .....	58
3.5.1 Praćenje mikrobnog rasta .....	58
3.5.2 Određivanje koncentracije glicerola, mlečne kiseline i glukoze .....	58
3.5.3 Određivanje koncentracije antibiotika.....	59
3.5.4 Određivanje sadržaja ulja algi .....	59
4 REZULTATI I DISKUSIJA.....	61
4.1 Biosinteza mlečne kiseline bakterijom <i>Enterococcus faecalis</i> MK3-10A.....	61
4.2 Biosinteza antibiotika bakterijom <i>Streptomyces hygroscopicus</i> CH-7 .....	68
4.2.1 Biosinteza antibiotika na osnovnoj podlozi sa sojom uz dodatak čistog i otpadnog glicerola .....	68
4.2.2 Biosinteza antibiotika na podlozi sa glicerolom uz dodatak derivata izatina kao izvora azota.....	72
4.2.2.1 Uticaj derivata izatina na rast bakterije <i>Streptomyces hygroscopicus</i> CH-7 u podlogama sa glicerolom .....	73
4.2.2.3 Uticaj derivata izatina na sintezu antibiotika heksaena H-85 i azalomicina B .....	79
4.3 Biosinteza ulja izolovanim slatkovodnim algama.....	87
4.3.1 Izolacija i identifikacija mikroalgi.....	87
4.3.2 Biosinteza ulja gajenjem izolata slatkovodnih algi na podlogama sa glicerolom .....	87
4.3.3 Promena koncentracije biomase algi u podlogama sa glicerolom.....	88

4.3.4 Potrošnja glicerola .....	92
4.3.5 Sadržaj produkovanog ulja algi .....	94
5 ZAKLJUČCI.....	98
6 LITERATURA .....	102
7 PRILOG .....	137

# 1. Uvod

U današnje vreme sa razvojem industrije, novih tehnologija i mašina, kao i porastom potrebe za transportom, drastično su povećane potrebe za energijom. Najčešće se koristi energija fosilnih goriva, kao što su benzin i dizel gorivo, dobijeni iz nafte, čije su rezerve sve manje. Pored toga, ogromna upotreba ovih goriva je dovela do globalnog ekološkog poremećaja. Negativni rezultati dugogodišnje upotrebe fosilnih goriva doveli su do potrebe za hitnim iznalaženjem ekoloških i neiscrpnih bioobnovljivih goriva. Trenutno, najviše proučavana i najperspektivnija biogoriva su: biodizel, biogas i etanol.

Biodizel privlači sve više pažnje poslednjih godina, pa se kapaciteti za njegovu proizvodnju stalno razvijaju, unapređuju i uvećavaju. On i etanol predstavljaju dva najvažnija i najbolje proučena alternativna bioobnovljiva goriva čijom se primenom nastoji efikasno smanjiti globalnu zavisnost od fosilnih goriva i emisiju gasova koji izazivaju efekat staklene bašte.

Biodizel se može proizvoditi od obnovljivih izvora, kao što su: biljna ulja, životinjske masti, ulja algi i sirova i korišćena ulja i masti. Kao sporedni proizvod proizvodnje biodizela dobija se glicerol (1 deo glicerola na 9 delova biodizela). Svetska proizvodnja biodizela u 2016 godini beleži porast za 42 % u odnosu na prethodnu godinu, odnosno proizvedeno je oko 140 milijardi litara biodizela, pri čemu je dobijeno približno 15 milijardi litara otpadnog glicerola (Garlapati i sar., 2016). Predviđeno je, takođe, da će 2020 godine globalna proizvodnja biodizela dostići skoro 190 - 200 milijardi litara (Garlapati i sar., 2016; Nanda i sar., 2014).

Sa znatnim povećanjem industrijske proizvodnje biodizela širom sveta, stvorene su ogromne zalihe glicerola, pa su cene čistog i otpadnog glicerola na svetskom tržištu u znatnom padu (Nanda i sar., 2014). Sirovi, odnosno otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela sadrži 15-80 % glicerola (Nanda i sar., 2014; Thompson i He, 2006; Yang i sar., 2012) i mnoge nečistoće, kao što su zaostali katalizator, metanol, voda, sapuni, slobodne masne kiseline, soli i estri formirani tokom reakcije, a što zavisi od, pre svega, osnovne sirovine i načina dobijanja biodizela. Prečišćavanje glicerola je veoma zahtevan i skup proces, pa se teži njegovom iskorišćenju u onakvom stanju u kakvom je dobijen.

Dakle, razvoj održivih procesa iskorišćenja otpadnog glicerola je imperativ i ima značajan uticaj na ekonomičnost proizvodnje biodizela (Yang i sar., 2012). Dok je čist glicerol značajna komercijalna sirovina sa širokom primenom u farmaceutskoj, kozmetičkoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji, otpadni glicerol predstavlja potencijalnu značajnu sirovinu za neke nove procese (da Silva i sar., 2009a; Garlapati i sar., 2016; Konstantinović i sar., 2016; Nanda i sar., 2014; Tan i sar., 2013). Jedna od mogućnosti primene je njegovo korišćenje kao izvora ugljenika u hranljivim podlogama za gajenje mikroorganizama u industrijskim fermentacijama u kojima se dobijaju komercijalno značajni proizvodi.

Lako dostupni i jeftini izvori ugljenika, kao glukoza, ograničavaju upotrebu glicerola kao nutrijenta u fermentacijama. Glukoza je i dalje visoko konkurentna glicerolu kao sirovine za industrijske fermentacije. Veliki višak glicerola iz proizvodnje biodizela može učiniti bioprocese sa glukozom kao sirovinom znatno skupljim u odnosu na bioprocese sa glicerolom kao izvorom ugljenika i energije.

Glicerol ima veći stepen redukcije u odnosu na druge šećere, a takođe je jeftiniji i lakše dostupan. Osim toga, iskorišćenje otpadnog glicerola ublažava ugljeničnu kataboličku represiju koja je prisutna kod iskorišćenja glukoze. U sličaju ugljenične kataboličke represije, prisustvo brzo metabolišućih izvora ugljenika, kao što je glukoza, inhibira ekspresiju kodiranih genskih proteina neophodnih za iskorišćenje alternativnih izvora ugljenika, kao što su glicerol i laktoza (da Silva i sar., 2009a).

Veliki broj mikroorganizama može metabolisati glicerol aerobno, dok je mali broj onih koji to mogu činiti anaerobno. Mnogi mikroorganizmi, kao što su bakterije *Echerichia coli*, bakterije roda *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Gluconobacter* i *Clostridium*, kvasci roda *Candida*, plesni roda *Aspergillus* i drugi, mogu uspešno konvertovati glicerol u vredne proizvode (Garlapati i sar., 2016; Wilkens i sar., 2012; Zhang i sar., 2010; Zhao i sar., 2006).

Sprovedena su mnoga istraživanja bazirana na biokonverziji glicerola u cilju povećanja prinosa vrednih proizvoda, kao što su: 1,3-propandiol, mlečna i limunsaka kiselina, *n*-butanol, etanol, polinezasićene masne kiseline i drugi (Yang i sar., 2012). Genetskim inženjeringom se mogu unaprediti sojevi mikroorganizama koji imaju sposobnost konverzije glicerola u vredne proizvode u smislu povećanja prinosa proizvoda (Doi, 2015; Jansen i sar., 2012a; Zhao i sar., 2006).

Bakterije roda *Streptomyces*, kao i većina aktinomiceta, imaju sposobnost korišćenja glicerola kao izvora ugljenika. Bakterija *Streptomyces hygroscopicus* podjednako dobro raste i proizvodi antibiotike na podlogama sa glicerolom ili glukozom (Ilić i sar., 2010b). Neki izolovani sojevi ove bakterije proizvode antibiotske supstance koje deluju inhibitorno na Gram pozitivne bakterije, kvasce i gljive (Gesheva i sar., 2005).

Pored izvora ugljenika u supstratu, značajan uticaj na rast i produktivnost (biosintezu antibiotika) ima i izvor azota (aminokiseline, neorganske soli, organske supstance) (Ilić i sar., 2013). Istraživanja sa sojem *S. hygroscopicus* CH-7 su pokazala da derivati izatina, odnosno Schiff-ove baze, kao izvor azota, imaju stimulatívno dejstvo na rast i produkciju antibiotika (Ilić i sar., 2010a). Derivati izatina poseduju različite biološke aktivnosti, kao što su antimikrobna, antivirusna, antikancerogena i anti-HIV (Konstantinović i sar., 2008).

Nove tehnologije koje uključuju put konverzije glicerola do industrijski značajnih proizvoda mogu brzo izmeniti tržišni scenario biogoriva. Umesto da ga posmatraju kao otpad, što je činjeno ranije, proizvođači biogoriva uviđaju da je otpadni glicerol vredan resurs za proizvodne procese. Ovo bi moglo da promeni situaciju na tržištu grana industrije koje u potpunosti zavise od proizvodnje glicerola i usmeri ih ka snabdevanju glicerolom iz industrije biogoriva. U poređenju sa konvencionalnom katalizom, biokonverzija glicerola je manje proučavana oblast. Mnoge od postojećih tehnologija biokonverzije glicerola su još uvek nedovoljno ispitane i treba ih unapređivati kako bi bile isplative i operativno izvodljive za primenu u industriji.

Glicerol ima potencijal da postane jedan od najjeftinijih prirodnih supstrata mikrobiološke konverzije u industrijski značajne metabolite. Potražnja za glicerolom i njegova cena mogu značajno porasti ukoliko dođe do iznalaženja i potvrđivanja mogućnosti njegove mikrobiološke konverzije i upotrebe u industrijskim fermentacijama.

U okviru ove disertacije proučavana je mogućnost mikrobiološkog iskorišćenja otpadnog glicerola dobijenog kao sporednog proizvoda u proizvodnji biodizela od suncokretovog i repičinog ulja, i to mogućnost gajenja na laboratorijskom nivou:

- mlečnokiselinske bakterije *Enterococcus faecalis* MK3-10A za dobijanja mlečne kiseline,
- bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 na podlozi sa glicerolom kao izvorom ugljenika u cilju dobijanja i povećanja prinosa antibiotika, pri čemu je praćen i uticaj nekih derivata izatina sintetisanih u otpadnom glicerolu iz proizvodnje biodizela, kao izvora azota, na rast mikroorganizma i glicerola i
- jednoćelijskih algi izolovanih iz slatkovodnih bara radi dobijanja ulja.

Zbog poređenja, pored otpadnog glicerola i derivata izatina, korišćeni su „čist“ glicerol i glukoza, kao izvor ugljenika i energije, i konvencionalni izvori azota. Predmet mikrobioloških istraživanja obuhvata praćenje kinetike promene biomase mikroorganizama, potrošnje izvora ugljenika i produkcije metabolita (antibiotika bakterije *S. hygroscopicus* CH-7, mlečne kiseline bakterije *E. faecalis* MK3-10A i ulja algi).

Na osnovu analize rezultata dosadašnjih i planiranih istraživanja, ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

- procena mogućnosti mikrobiološkog iskorišćenja otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela za dobijanje značajnih metabolita, i to mlečne kiseline pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A, antibiotika (heksaen H-85 i azalomicin B) pomoću bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 i ulja pomoću jednoćelijskih algi izolovanih iz slatkovodnih bara,
- razvoj procesa fermentacija radi iznalaženja novih mogućnosti potrošnje otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela,
- utvrđivanje uticaja nekonvencijalnih izvora azota, kao što su izatinske Schiff-ove baze na potrošnju otpadnog glicerola i produkciju sekundarnih metabolita bakterije *S. hygroscopicus* CH-7,



- poređenje efikasnosti mikrobiološkog procesa produkcije antibiotika korišćenjem otpadnog glicerola i nekonvencionalnih izvora azota sa procesom u kojem se koriste konvencionalni izvori ugljenika i azota i
- poređenje efikasnosti proučavanih mikrobioloških procesa sa bakterijom *S. hygroscopicus* CH-7 i mlečnokiselinskom bakterijom *E. faecalis* MK3-10A u kojima je korišćen otpadni glicerol i procesa u kojima su korišćeni konvencionalni izvori ugljenika (čist glicerol i glukoza), kao i mikrobioloških procesa sa izolovanim jednoćelijskim algama u kojima je korišćen otpadni glicerol kao izvor ugljenika sa procesima u kojima nije korišćen izvor ugljenika.

## 2. Teorijski deo

### 2.1 Biodizel i sirovine za dobijanje

Potrošnja fosilnih goriva ima izrazito negativan uticaj na životnu sredinu i može izazvati ogromne probleme svetskoj populaciji. Usled intenzivnog povećanja potrošnje energije, javila se potreba za pronalaženjem novih izvora energije koji zadovoljavaju postojeće kriterijume vezane za obnovljivost, ekologiju i pouzdanost korišćenja. Jedan od ključnih faktora budućih razvojnih strategija za rešavanje energetske krize su obnovljivi izvori energije. Većina zemalja Evropske unije, kao i većina zemalja u razvoju pokrenule su, poslednjih decenija, primenu obnovljivih izvora energije, među kojima značajno mesto zauzima biodizel (Gerpen, 2005).

Biodizel je smeša metil-estara viših masnih kiselina, koji nastaju iz triacilglicerola ili slobodnih masnih kiselina iz ulja ili masti biljnog i životinjskog porekla i metanola ili etanola u reakcijama transesterifikacije i esterifikacije, redom i koja ispunjava specifikacije standarada za biodizel (Knothe, 2005). Pouzdanost, odnosno kvalitet biodizel goriva je zagarantovana standardom EN 14214 (Furman i sar., 2002). Biodizel, kao obnovljivo tečno biogorivo, u potpunosti može zameniti fosilno dizel gorivo za motore sa unutrašnjim sagorevanjem i može se mešati u svim odnosima sa D-2 ili evrodizel gorivom (Mičić i sar., 2013). Glavna prednost biodizela kao obnovljivog goriva je znatno smanjenje emisije ugljenik(IV)-oksida, suspendovanih čestica i ugljenik(II)-oksida (Knothe, 2005). Biodizel ima čitav niz prednosti u odnosu na fosilni dizel:

- biorazgradiv je (Mustapić i sar., 2006),
- zatvara krug emisije i utroška ugljenik(IV)-oksida (Randal 1999),
- ne sadrži sumpor (Randal 1999),
- sadrži oksidanate koji poboljšavaju procese sagorevanja i smanjuju emisiju ugljenik(II)-oksida (Aydin i Bayindir,2010; Ozsezen i Canakci, 2010),
- sadržaj benzena u produktima sagorevanja biodizel goriva je manji od  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Randal 1999),

- emisija koksni čestica (čadi) je za 40 % manja nego kod fosilnog dizela (Randal 1999) i
- pogodan je za rukovanje i čuvanje zbog visoke tačke paljenja (150°C) (Mustapić i sar., 2006).

U proizvodnji biodizela najznačajniji proces je transesterifikacija izvora triacilglicerola, najčešće rafinisanog biljnog ulja. Sirovo ulje se iz semena uljarica dobija ceđenjem (presovanjem), ekstrakcijom ili kombinovanjem ova dva procesa. Da bi se lakše izvršilo ceđenje ulja, zrno je neophodno očistiti, oljuštiti (suncokret i soja), a potom samleti i kondicionirati (vlaženjem i prženjem) (Mustapić i sar., 2006).

U svetu se koriste različite sirovine za proizvodnju biodizela. Tu prednjače jestiva ulja dobijena ceđenjem većeg broja uljarica. Zbog visoke cene i nedostatka sirovina za proizvodnju biodizela širom sveta se intenzivno vrše istraživanja koja treba da ukažu na mogućnost proizvodnje biodizela od nejestivih ulja (Banković-Ilić i sar., 2012), životinjskih masti (Banković-Ilić i sar., 2014), otpadnih kuhinjskih ulja, ulja koja proizvode alge i bakterije, otpada od prerade hrane i raznog gradskog otpada (Kulkarni i sar., 2006; Lam i sar., 2010).

### **2.1.1 Glicerol kao sporedni proizvod u proizvodnji biodizela**

Glicerol predstavlja značajan nusproizvod u proizvodnji biodizela transesterifikacijom, u proizvodnji sapuna saponifikacijom, odnosno u reakciji hidrolize. Zbog znatnog porasta proizvodnje biodizela, poslednjih nekoliko godina se javilo veće interesovanje za prečišćavanje i konverziju glicerola u neke vredne proizvode.

Glicerol ima mnogostruku upotrebu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Može se dobiti kao nusproizvod u reakcijama saponifikacije i hidrolize u postrojenjima za preradu ulja, kao i postrojenjima za dobijanje biodizela transesterifikacijom (Ueoka i Katayama, 2001). Ovako dobijen glicerol u sirovoj formi sadrži mnoge nečistoće u zavisnosti od procesa i materijala od kojeg je dobijen, pa se zato posmatra kao sirovi materijal (Amin i sar., 2010; Ueoka i Katayama, 2001).

Pored glicerola, otpadni glicerol dobijen proizvodnjom biodizela sadrži vodu, organske i neorganske soli, sapun, alkohol, tragove glicerida, kao i bojene materije (Hajek i Skopal, 2010), dok otpadni glicerol dobijen u reakciji hidrolize sadrži glicerol, vodu, slobodne masne kiseline, neizreagovane triacilglicerole, organske i neorganske soli i druge organske neglicerolske materije (Ueoka i Katayama, 2001). Saponifikacionim reakcijama se dobija otpadni glicerol koji sadrži i masne kiseline i soli (Ooi i sar, 2001). Otpadni glicerol je proizvod niske cene zbog male čistoće, što ograničava njegovu primenu kao sirovine za neke industrijske procese. Razvoj procesa konverzije otpadnog glicerola u neke druge vredne proizvode se temeljno istražuje, pri čemu mnoge tehnike nisu široko prihvaćene.

Čist glicerol se može prodati kao roba jer je neophodan kao industrijska sirovina posebno u nekim granama hemijske industrije. Zbog toga, da bi se proizveo glicerol visoke čistoće, neophodan je razvoj metoda prečišćavanja (Manosak i Limpattayanate, 2001). Trenutno je razvijen veliki broj tehnika prečišćavanja otpadnog glicerola, kao što su: konvencionalna filtracija, mikrofiltracija i ultrafiltracija korišćenjem membrana organskih polimera, obična destilacija, vakuum destilacija, hemijski i fizički tretmani, jonoizmenjivačke tehnike i adsorpcija. Kombinacija dve ili više tehnika prečišćavanja vodi ka postizanju veće čistoće glicerola (Isahak i sar, 2010).

### **2.1.2 Fizička i hemijska svojstva glicerola**

Glicerol je organsko jedinjenje hemijske formule  $C_3H_8O_3$  koje se sreće i pod nazivima glicerin, propan-1,2,3-triol, 1,2,3-propantriol, 1,2,3-trihidroksiopropan, gliceritol i glicil alkohol. Glicerol je trohidroksilni alkohol koji se može dobiti iz prirodnih i petrohemijskih sirovina (Shawn, 2008). Potpuno je netoksičan za ljude i životnu sredinu. Fizički, glicerol je bistra, bezbojna, bez mirisa, higroskopna, viskozna tečnost slatkastog ukusa. Tačka ključanja, tačka topljenja i tačka paljenja glicerola iznose  $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $177\text{ }^{\circ}\text{C}$ , redom (Speight, 2002). Pod normalnim uslovima, glicerol ima molekulsku masu od  $92,09\text{ g/mol}$ , gustinu  $1261\text{ kg/m}^3$  i viskozitet  $1,5\text{ Pa}\cdot\text{s}$  (Mario i Michele, 2010).

U tabeli 2.1, date su fizičke karakteristike glicerola pod normalnim i drugim uslovima. Prostorne intermolekulske vodonične veze su odgovorne za visok viskozitet i tačku ključanja glicerola. Glicerol se ne menja u kontaktu sa vazduhom, ali apsorbuje vlagu iz vazduha (Mario i Michele, 2010). Tri hidroksilne grupe glicerola su odgovorne za njegovu rastvorljivost. Potpuno je rastvoran u vodi i alkoholima, slabo rastvoran u etru i dioksanu, a nerastvoran u ugljovodonicima (Mario i Michele, 2010). Zbog prisustva hidroksilne grupe, dobar je rastvarač za mnoge supstance, kao što su jod, brom i fenol. Hemijski je stabilan u normalnim uslovima skladištenja i rukovanja, ali ipak može postati eksplozivan kada je u kontaktu sa jakim oksidacionim sredstvima, kao što je kalijum-hlorat. Zbog prisustva alkoholnih grupa koje se mogu menjati drugim hemijskim grupama, glicerol je reaktivan i može učestvovati u brojnim reakcijama. Osim toga, podleže raznim reakcijama formiranja derivata, kao što su etri, estri, amini i aldehidi.

Tabela 2.1 Fizička svojstva glicerola (Knothe, 2005)

<b>Osobina</b>	<b>Vrednost</b>
Tačka topljenja (°C)	18,17
Tačka ključanja (°C)	
0,53 kPa	14,9
1,33 kPa	166,1
13,33 kPa	22,4
101,3 kPa	290
Gustina, 25 °C	1,2620
Napon pare (Pa)	
50 °C	0,33
100 °C	526
150 °C	573
200 °C	6100
Površinski napon (20 °C, mN/m)	63,4
Viskozitet (20 °C, mPas)	1499
Toplota isparavanja (J/mol)	
55 °C	88,12
95 °C	76,02
Toplota formiranja (kJ/mol)	5,778
Koeficijent toplotne provodljivosti [W/(mK)]	0,28
Tačka paljenja	
Cleveland-ov otvoreni sud (°C)	177
Pensky-Martines-ov zatvoreni sud (°C)	199
Tačka paljenja (°C)	204

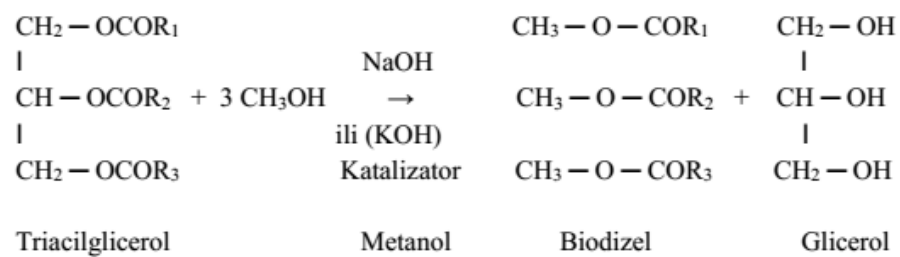
## 2.2 Dobijanje glicerola

### 2.2.1 Reakcije transesterifikacije

Glicerol se može dobiti transesterifikacijom triacilglicerola iz masti i ulja u proizvodnji biodizela. Transesterifikacija je hemijska reakcija u kojoj masti i ulja (tj. triacilgliceroli) reaguju sa alkoholom (metanol ili etanol) u višku uz odgovarajuće uslove, kao što su povišena temperatura, pritisak ili prisustvo hemijskog ili enzimskog katalizatora, pri čemu nastaju alkil estri masnih kiselina i glicerol kao nusproizvod (slika 2.1).

Reakcije transesterifikacije se mogu izvesti u šaržnom ili kontinualnom procesu. Tokom odvijanja reakcije transesterifikacije dolazi do formiranja dve faze koje su bogate biodizelom (površinski sloj), odnosno glicerolom (donji sloj), zbog razlika u njihovoj gustini i polaritetu (Hasheminejad i sar., 2011; Sdrula, 2010). Proizvodnjom 100 kg biodizela, dobija se približno 10 kg nečistog, otpadnog odnosno otpadnog glicerola čistoće 50-55 % (Ooi i sar., 2001). Glicerol dobijen procesom transesterifikacije ima veći sadržaj soli i viška alkohola. Danas je proizvodnja biodizela transesterifikacijom masti i ulja postala glavni izvor dobijanja glicerola. Međutim, drastičan porast industrije biodizela izazvao je pojavu viška glicerola, što je rezultiralo smanjenjem cene glicerola (Lopez i sar., 2009).

Sirovine koje sadrže ulja ili masti (tj. triacilglicerole i slobodne masne kiseline) mogu se koristiti za proizvodnju biodizela. Troškovi sirovine predstavljaju 75 % od ukupne cene proizvodnje biodizela, tako da je izbor sirovine jako važan za sniženje cene biodizela (Ahmad i sar., 2011). Generalno, sirovine za biodizel se mogu svrstati u tri grupe: prve, druge i treće generacije, kao što je dato u tabeli 2.2 (Tan i Abdul Aziz, 2013). Međutim, nezavisno od vrste sirovine korišćene za proizvodnju biodizela, procesom homogeno ili heterogeno katalizovane transesterifikacije, glicerol će se dobiti kao glavni nusproizvod.



Slika 2.1 Šematski prikaz dobijanja biodizela transesterifikacijom ulja ili masti

Tabela 2.2 Aktuelne sirovine za proizvodnju biodizela

Sirovina	Tip	Napomena
Prva generacija	Palmino ulje (Singh i Singh, 2009)	Poznata kao jestiva sirovina (Ahmad i sar.,2011)
	Repičino ulje (Lang i sar., 2001; Singh i Singh, 2009)	Ovo ulje ima ograničenja zbog izazivanja konkurencije na tržištu jestivih ulja (Kansedo i sar., 2009)
Druga generacija	Sojino ulje (Alcantara i sar., 2000; Haas, 2005)	Visok uticaj natržištu hrane i bezbednost (Brennan i Owende, 2010 )
	Suncokretovo ulje (Antolín i sar., 2002; Lang i sar., 2001)	Negativan uticaj na životnu sredinu zbog velikih površina zemlje koja mora biti zauzeta za useve biodizela (Ahmad i sar.,2011)
	Kikiriki ulje (Singh i Singh, 2009)	
	Ulje jatrofe (Aransiola, 2013; Kumar i sar., 2012)	Smanjuje konkurenciju sa jestivim sirovinama (Wang Y. i sar., 2009)
Treća generacija	Morski mango (Kansedo i sar., 2009)	Ekološki prihvatljiv zbog manjeg zahteva za obradivom površinom (Pinzi i sar., 2009)
	Ulje semena duvana (Usta, 2005; Veljković i sar., 2006)	Loš učinak na niskim temperaturama (Ahmad i sar.,2011)
	Ulje lososa (Reyes i Sepu'lveda, 2006)	Upotreba životinjskih masti dovodi do pitanja biološke bezbednosti zbog mogućnosti upotrebe zaraženih životinja (Janaun i Ellis, 2010)
	Otpadna jestiva ulja (Singh i Singh, 2009)	
	Loj (Alcantara i sar., 2000 )	
Treća generacija	Mikroalge (Ahmad i sar.,2011; Moazami i sar., 2012; Chisti, 2007; Moazami i sar., 2011)	Brza reprodukcija zbog jednostavnosti gajenja (Chisti, 2007)
		Ekonomičan, obnovljiv i ugljenično neutralan izvor biogoriva (Moazami i sar., 2012 )
		Povećana efektivnost troškova (Ahmad i sar.,2011)
		Ekološki prihvatljive kako ne stvaraju konkurenciju za poljoprivredne useve i imaju sposobnost vezivanja ugljenik(IV)-oksida iz atmosfere (Danquah i sar., 2009)
		Produkuju vredne nusproizvode kao što su biopolimeri i proteini (Rodolfi i sar., 2009 )



## 2.2.2 Kiselo katalizovana transesterifikacija

Reakcija transesterifikacije može biti katalizovana bazama, kiselinama ili enzimima. Proces kiselo katalizovane transesterifikacije je pogodniji kada se koriste otpadna ili nerafinisana ulja, ali se ne primenjuje kao bazno katalizovana transesterifikacija zbog sporijeg odvijanja reakcije i neophodnosti visokog molskog odnosa metanola i ulja (Soriano i sar., 2009).

Reakcija kiselo katalizovane transesterifikacije se može izvesti u homogenom i u heterogenom sistemu. Kao kiseli homogeni katalizatori, primenjuju se mineralne kiseline, poput sumporne, fosforne, hlorovodonične i drugih. Njihova aktivnost je značajno manja u odnosu na bazne homogene katalizatore. Pored toga, kiseli homogeni katalizatori su vrlo korozivni i zahtevaju upotrebu aparature izrađenu od skupih materijala.

Zbog ovih nedostataka, kiseli katalizatori se mnogo manje primenjuju. Međutim, u poslednje vreme se pojavilo interesovanje za ove katalizatore zbog toga što na njih ne utiče prisustvo slobodnih masnih kiselina u sirovini za dobijanje biodizela. (Encinar i sar., 2011; Koh i Mohd, 2011; Saravanan i sar., 2010). Tokom procesa homogene kisele transesterifikacije, triacilgliceroli se konvertuju u alkil estre masnih kiselina (biodizel) i glicerol. Reakcija se odvija sporo i zahteva višu temperaturu za odvijanje.

S druge strane, veliki broj istraživača je proučavao uticaj heterogenih (čvrstih) kiselih katalizatora za dobijanje biodizela (Bournay i sar., 2005). Pretpostavljalo se da čvrsti kiseli katalizatori imaju veliki potencijal da zamene tečne zbog njihove neosetljivosti na slobodne masne kiseline, zbog lakšeg razdvajanja od reakcionog medijuma, kao i smanjenja problema korozije. Heterogena kiselo katalizovana transesterifikacija se može izvoditi uz pomoć gvožđe-cink cijanida, cirkonijum oksida, kombinovanih oksida magnezijum-cirkonijum ili cink-cirkonijum, titanijum oksida i drugih (Bournay i sar., 2005; Kim i sar., 2011a; Soriano i sar., 2009; Sree i sar., 2009). Glicerol dobijen heterogenom kiselo katalizovanom esterifikacijom može biti znatno više čistoće, čak do 98 % (Bournay i sar., 2005).

### 2.2.3 Bazno katalizovana transesterifikacija

Bazna kataliza se najčešće primenjuje zbog velike aktivnosti baznih katalizatora. Njihova dodatna prednost je manja korozivnost u odnosu na kisele, pa samim tim zahtevaju jeftiniju opremu. Kao bazni homogeni katalizatori, koriste se alkalni hidroksidi (NaOH, KOH) (Hara 2009; Koh i Mohd, 2011; Zabeti i sar., 2009), alkoksidi (NaOCH<sub>3</sub>, KOCH<sub>3</sub>, NaOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) i karbonati (da Silva i sar., 2006, 2009b; Meneghetti i sar., 2006). Baznu homogenu katalizu odlikuje velika brzina reakcije i visok prinos biodizela.

U industrijskim uslovima, danas se najčešće koriste natrijum i kalijum hidroksid (Atadashi i sar., 2013), dok alkoksidi daju bolje rezultate (Ganesan i sar., 2009). Međutim, cena i problemi pri rukovanju čini alkoksidi manje isplativim. Alkalni metali i alkoksidi su poželjni katalizatori zbog skraćivanja vremena potrebnog za odvijanje reakcije, povećanja prinosa i zbog niske koncentracije u kojoj se koriste (Schuchardt i sar., 1998). Kao heterogeni bazni katalizatori se najčešće koriste kombinovani oksidi (Ca-Mg, Mg-Al, Mg-La, Ca-Mn, Ca-Zn) (Babu i sar., 2008; Dias i sar., 2012,2013; Liu i sar., 2007; Taufiq-Yap i sar., 2011; Vyas i sar., 2009), kombinovani oksidi i hidroksidi (CaO-KOH, MgO-KOH, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-KOH) (Mutreja i sar., 2011; Huong i sar., 2011), nanokristalni oksidi (CaO) (Reddy i sar., 2006) i drugi. Kod heterogene bazne katalize, prednost je i jednostavnije odvajanje katalizatora od proizvoda nakon završene reakcije, kao i mogućnost ponovnog korišćenja katalizatora (Lam i sar. 2010).

Da bi se obezbedila potpuna konverzija sirovine u estere, količina alkohola mora biti u višku. Glicerolna frakcija sadrži znatno veću količinu metanola od estarske, čije uklanjanje je neophodno. Pri bazno katalizovanoj transesterifikaciji, triacilgliceroli i alkohol moraju biti anhidrovani jer prisustvo vode dovodi do stvaranja sapuna. Saponifikacija smanjuje prinos estara i otežava separaciju estara i glicerola.

Takođe, prisustvo vode, naročito na višim temperaturama može dovesti do hidrolize triacilglicerola do diacilglicerola i formiranja slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline mogu reagovati sa alkalnim katalizatorom prevodeći ga u formu sapuna i čineći ga nepogodnim za ubrzavanje reakcije transesterifikacije.

Nakon odstranjivanja metanola, vrši se neutralizacija zaostalog katalizatora i ispiranje i dehidracija biodizela. Pre upotrebe u dizel motorima, neophodno je izvršiti kontrolu kvaliteta dobijenog biogoriva. Glicerol se nakon separacije, takođe, podvrgava neutralizaciji katalizatora i odvajanju metanola (Demirbas, 2008).

#### **2.2.4 Enzimski katalizovana transesterifikacija**

Primena enzimske katalize za dobijanje biodizela je trenutno predmet širokog interesovanja i proučavanja. Poznato je da lipaze katalizuju reakcije transesterifikacije, esterifikacije i hidrolize, pa se mogu primeniti i za dobijanje biodizela (Tongboriboon i sar., 2010). Lipaze imaju visoku katalitičku aktivnost i u sredinama sa niskim sadržajem vode. Prednosti upotrebe lipaza su istovremena kataliza (alkoholiza triacilglicerola i esterifikacija slobodnih masnih kiselina), jednostavno nastajanje glicerola, mogućnost upotrebe sirovina sa visokim sadržajem slobodnih masnih kiselina, kao i minimalno stvaranje nečistoća (de Oliveira i sar., 2004).

S obzirom da u procesu enzimske katalize ne dolazi do reakcija saponifikacije, razdvajanje biodizela i glicerola je znatno jednostavnije (Lara i Park, 2003). Enzimski katalizovanom transesterifikacijom dobija se glicerol visoke čistoće, stvaranje i odvajanje proizvoda je jednostavno, neophodni su blagi uslovi za odvijanje reakcije i postoji mogućnost ponovnog korišćenja katalizatora (Kulkarni i Dalai, 2006). Optimalna temperatura za enzimski katalizovanu transesterifikaciju je 30-50 °C (Da Rós i sar., 2010; Huang i sar., 2010). Da bi se dobili enzimi za višekratnu upotrebu, lipaze se najčešće imobilizuju, što omogućava njihovu jednostavnu obnovu i nižu cenu.

Poreklo lipaza je glavni faktor koji utiče na prinos estara (de Oliveira i sar., 2004). Imobilisane lipaze su poreklom iz raznih mikroorganizama i bioloških materijala, kao što su *Candida antractica* (Kumar i sar., 2011; Wang i Zhang, 2010), *Chromobacterium viscosum* (Kumar i sar., 2011; Shah i sar., 2004), *Mucor miehei* (de Oliveira i sar., 2004), *Pseudomonas cepacia* (Kumari i sar., 2007), *Rhizomucor oryzae* (Li i sar., 2011) i pankreas (Chattopadhyay i sar., 2011). Komercijalne lipaze Novozim 435 i Lipozim TLIM, pokazali su se kao efektivni katalizatori za proizvodnju biodizela (Huang i sar., 2010; Tamalampudi i sar., 2008).

Kao nosači za imobilizaciju enzima se najčešće koriste celit, makroporozna akrilna smola, makroporozna jonoizmenjivačka smola, silicium-dioksid i poliuretanska pena (Shah i sar., 2004). Za dobijanje biodizela pomoću slobodno suspendovanih enzima najčešće se koriste šaržni reaktori (Bajaj i sar., 2010; de Oliveira i sar., 2004; Huang i sar., 2010).

Enzimski katalizovana transesterifikacija je razvijana kako bi se prevazišli problemi kisele, odnosno bazne katalizovane transesterifikacije. U tabeli 2.3, dat je prikaz prednosti i nedostataka različitih tipova reakcija transesterifikacije, kao i vrsta korišćenih katalizatora. Glavni problemi kiselo i bazno katalizovane transesterifikacije su visoki energetska zahtevi, mogućnost zagađenja životne sredine i poteškoće obnavljanja i prečišćavanja katalizatora i glicerola (Lara i Park, 2003).

Međutim, postoje velike mane enzimske katalize kada se primenjuje u industrijskim uslovima, kao što su visoka cena enzima, mala brzina odvijanja reakcije i deaktivacija enzima (Bajaj i sar., 2010; Lara i Park, 2003). Niži alkoholi, kao što su metanol i etanol, koji se uobičajeno koriste u proizvodnji biodizela, mogu deaktivirati imobilisane lipaze. Etanol je pogodniji za enzimski katalizovane reakcije zbog nižeg stepena deaktivacije lipaza (Modi i sar., 2006). Neki autori (Modi i sar., 2006, Su i sar., 2009) tvrde da se korišćenjem propan-2-ola, etil acetata ili dietil karbonata može prevazići inaktivacija lipaza. Druga rešenja uključuju postepeni dodatak metanola (de Oliveira i sar., 2004).

Tabela 2.3 Prednosti i nedostaci različitih tipova reakcije transesterifikacije i vrsta korišćenih katalizatora (Lam i sar. 2010)

Tip katalizatora		Prednosti	Nedostatci
Homogeno-bazni katalizator	- NaOH - KOH - NaOCH <sub>3</sub> - KOCH <sub>3</sub> - NaOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	- Veoma brzo odvijanje reakcije - Reakcija se može odvijati pod blagim reakcionim uslovima uz manje energetske zahteve - Može se postići visoka konverzija - Ovi katalizatori su široko dostupni i isplativi	- Ograničenije korišćenja ulja sa sadržajem SMK nižim od 0,5 % masenih - Dolazi do formiranja sapuna ukoliko je sadržaj SMK viši od 2 % masenih - Preterano formiranje sapuna će smanjiti prinos biodizela i dovesti do problema tokom prečišćavanja proizvoda
Heterogeno-bazni katalizator	- CaO - MgO - ZnO - MnO	- Relativno brza reakcija u odnosu na kiselo katalisanu transesterifikaciju - Reakcija se može odvijati pod blagim reakcionim uslovima uz manje energetske zahteve - Jednostavno odvajanje katalizatora od proizvoda - Velika mogućnost ponovnog korišćenja regenerisanog katalizatora	- Osetljivost na sadržaj SMK zbog baznih osobina - Dolazi do formiranja sapuna ukoliko je sadržaj SMK viši od 2 % masenih - Preterano formiranje sapuna će smanjiti prinos biodizela i dovesti do problema tokom prečišćavanja proizvoda - Curenje katalizatora može izazvati kontaminaciju proizvoda
Homogeno-kiseli Katalizator	- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - HCl - H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	- Neosetljiva na sadržaj slobodnih masnih kiselina (SMK) i vode u ulju - Esterifikacija i transesterifikacija se mogu odvijati istovremeno - Reakcija se može odvijati pod blagim reakcionim uslovima uz manje energetske zahteve - Ekonomičniji od bazno katalisanog procesa	- Veoma sporo odvijanje reakcije - Korozivni katalizator može izazvati pojavu korozije na reaktoru i u cevovodima - Odvajanje katalizatora od proizvoda je problematično
Heterogeno-kiseli katalizator	- ZrO <sub>2</sub> - TiO <sub>2</sub> - SnO <sub>2</sub> - Zeolit	- Neosetljiva na sadržaj SMK i vode u ulju - Pogodna metoda ako se koriste nekvalitetna ulja - Esterifikacija i transesterifikacija se mogu odvijati istovremeno - Velika mogućnost ponovnog korišćenja regenerisanog katalizatora - Smanjeni problemi korozije	- Zbog katalizatora, postupak može biti skup - Neophodna visoka temperature za odvijanje reakcije i visok molarni odnos alkohol-ulje - Potrebno dosta vremena za reakciju - Curenje katalizatora može izazvati kontaminaciju proizvoda
Enzim	- <i>Mucor mihei</i> (Lipozim IM 60) - <i>C. antarctica</i> (Novozim 435) - <i>Bacillus subtilis</i>	- Neosetljiva na sadržaj SMK i vode u ulju - Pogodna metoda ako se koriste nekvalitetna ulja - Transesterifikacija se može odvijati na nižoj temperaturi čak nego što je to i homogeno bazne katalize - Samo je potreban jednostavan korak prečišćavanja	- Veoma sporo odvijanje reakcije, sporije i od kiselo katalisane transesterifikacije - Visoka cena - Osetljivost na alkohol, obično methanol može da deaktivira enzim

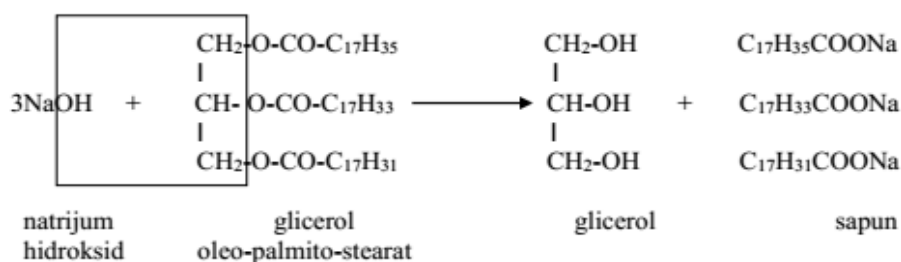
### 2.2.5 Odvajanje biodizela i glicerola

Reakciona smeša, nakon transesterifikacije, sastoji se od međusobno nemešljivih tečnih faza, estarske i glicerolne, različite gustine, pa se na tom principu i odvajaju. Alkoholna faza, glicerol i metanol, dispergovana u kontinualnoj estarskoj fazi u obliku kapljica veličina 100 do 500  $\mu\text{m}$  (Jurac, 2011; Knothe, 2005). Da bi se razdvojili metil-estri od metanola i glicerola, reakciona smeša se prebacuje u separator (obično gravitacionog tipa). Kako su kapljice alkoholne faze veće gustine od estarske faze, one se talože prema dnu separatora. Veći deo alkoholne faze izdvoji se iz smeše već nakon 15 minuta, ali je za potpuno taloženje potrebno više vremena, u nekim slučajevima i do 8 h. Nakon separacije, vrši se otakanje donje, alkoholne faze, a dobijeni metil-estri se odvoje na prečišćavanje radi uklanjanja zaostalog glicerola, katalizatora, metanola i ulja.

### 2.2.6 Saponifikacija

Glicerol se stvara u velikim količinama kao nusproizvod tokom procesa saponifikacije triacilglicerola u proizvodnji slobodnih masnih kiselina i masnih estara. Reakcija saponifikacije predstavlja hidrolizu masti i ulja (tj. triacilglicerola) bazama, pri čemu nastaju soli masnih kiselina (sapun) i glicerol (Tamalampudi i sar., 2008) (slika 2.2). Tri molekula sapuna i jedan molekul glicerola se formiraju u reakciji jednog molekula triacilglicerola i tri molekula baze.

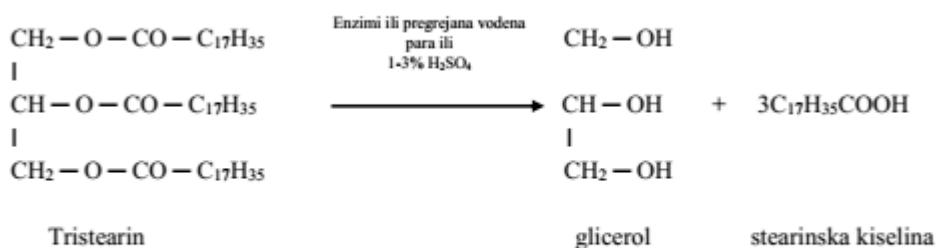
Kaustične baze reaguju spontano sa slobodnim masnim kiselinama i sapun se trenutno stvara pod adekvatnim uslovima mešanja i izazivanja početka reakcije (agitacija) (Bonato i sar., 1987). Nakon filtracije, sapun se odvoji, a u filtratu ostane 35 % glicerola, slobodne baze, rastvoreni sapun, nešto natrijum-hlorida i suspendovane nečistoće. Ova reakcija saponifikacije je osnova komercijalnog procesa proizvodnje sapuna. Prinos glicerola dobijenog tokom procesa proizvodnje sapuna iznosi 10 % od količine dobijenog sapuna. Shodno tome, bolji uslovi i tok reakcije, uz efikasnije prečišćavanje glicerola, direktno utiču na ekonomičnost proizvodnje sapuna velikih razmera (Israel i sar., 2008).



Slika 2.2 Šematski prikaz saponifikacije

### 2.2.7 Hidroliza

Masti i ulja mogu hidrolizovati u određene masne kiseline i glicerol. Hidroliza je reverzibilna reakcija prilikom koje molekul vode raskida estarske veze triacilglicerola, oslobađajući glicerol i masne kiseline (slika 2.3). U toku hidrolize triacilglicerola dolazi do izdvajanja lakše faze, koju čine masne kiseline, i teže faze, koju čini glicerol (Gunstone, 2004). Ovako dobijeni rastvor glicerola se naziva „slatka voda“. Tokom reakcije hidrolize, jedan mol triacilglicerola daje jedan mol glicerola i tri mola masnih kiselina. Otpadni glicerol, koji je dobijen hidrolizom masti i ulja, sadrži vodu i nečistoće, kao što su slobodne masne kiseline. Da bi se dobio glicerol visoke čistoće, neophodno je izvršiti njegovo prečišćavanje (Gunstone, 2004).



Slika 2.3 Šematski prikaz hidrolize

## 2.2.8 Prečišćavanje otpadnog glicerola

Otpadni glicerol ima visok sadržaj soli i slobodnih masnih kiselina, kao i izrazitu boju (žutu do tamno braon) (Sdrula, 2010). Zbog svog sastava, bez obzira na način na koji je dobijen, otpadni glicerol je lošeg kvaliteta. Tipičan sastav otpadnog glicerola dobijenog transesterifikacijom, saponifikacijom ili hidrolizom masti i ulja je dat u tabeli 2.4. Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela najčešće sadrži 15-80 % glicerola (Nanda i sar., 2014; Thompson i He, 2006; Yang i sar., 2012). Otpadni glicerol dobijen saponifikacijom sadrži 35 % masenih, dok slatka voda dobijena hidrolizom sadrži 15 % glicerola. Otpadni glicerol se može koncentrisati do sadržaja od 80 % (Amin i sar., 2010).

Tabela 2.4 Sastav otpadnog glicerola dobijenog transesterifikacijom, saponifikacijom i reakcijom hidrolize (Thompson i sar., 2006)

Komponenta	Transesterifikacija (%)	Saponifikacija (%)	Hidroliza (%)
Glicerol	75	83 – 84	88 – 90
Pepeo	10	8,5 – 9,5	0,7 – 1,0
Voda	10	6 – 7	8 – 9
Organske neglicerolne materije (ONGM)	5	3 – 4	0,7 – 1,0
Trimetilen glikol (Tmg)	1	0,1	0,2

Glicerol je odobren od strane mnogih vladinih organizacija za upotrebu u proizvodnji hrane i proizvodnji lekova, a koristi se i kao pomoćno sredstvo u kozmetici, farmakologiji, industriji hrane i pića, sredstvima za higijenu i sredstvima za negu (Wolfson i Dlugy, 2009). Primena otpadnog glicerola je veoma ograničena zbog prisustva soli i nečistoća, a njegova energetska vrednost je zanemarljiva.



Proizvodnjom biodizela stvaraju se milioni tona otpadnog glicerola godišnje, a ta količina brzo raste zajedno sa dramatičnim rastom industrije biodizela (Sdrula, 2010). Velika količina nečistog otpadnog, odnosno sirovog glicerola iz industrija biodizela i sapuna dostupna je po vrlo niskoj ceni jer proizvodni kapaciteti glicerola nadmašuju zahteve na tržištu. Ovo bi moglo smanjiti tržišnu cenu čistog glicerola što može destabilizovati tržište industrije ulja (Thompson i sar., 2006). Prema tome, da bi se otpadni glicerol koristio kao sirovina za proizvodnju nekih vrednih komercijalnih proizvoda, neophodno je izvršiti njegovo prečišćavanje do potrebnog stepena čistoće korišćenjem efektivnih i jeftinih tehnologija. Alternativa, koja može biti povoljnija zbog izbegavanja troškova prečišćavanja, jeste direktna primena otpadnog glicerola. Kvalitet glicerola iz proizvodnje biodizela je jako nizak, pa je nepogodan kao sirovina za mnoge primene. Takođe, njegovo odlaganje predstavlja problem u postrojenjima za proizvodnju biodizela. Zbog toga, potrebno je izvršiti prečišćavanje otpadnog glicerola, kako bi ispunio zahteve čistoće za dalju upotrebu (Stamatelatu, 2011).

Za prečišćavanje otpadnog glicerola se koriste različite metode, kao što su filtracija, destilacija, hemijski tretmani, adsorpcija (korišćenje aktivnog uglja), jonska razmena (korišćenje jonoizmenjivačkih smola), ekstrakcija i kristalizacija. Svaka metoda prečišćavanja zasnovana je na različitim svojstvima otpadnog glicerola (Stamatelatu, 2011). Tokom procesa prečišćavanja, kombinuju se dve ili više metoda kako bi se postigla visoka efikasnost prečišćavanja. Međutim, za sve metode prečišćavanja, neophodno je dobro poznavanje hemijskih i fizičkih karakteristika nečistoća koje su prisutne. Kombinovanje otklanjanja alkohola destilacijom, otklanjanje soli korišćenjem jonoizmenjivačkih smola i adsorpcija aktivnim ugljem se pokazalo kao dobar način prečišćavanja (Stamatelatu, 2011). Destilacija je najčešće primenjivana metoda prečišćavanja otpadnog glicerola kojom se vrši uklanjanje vode i metanola na osnovu razlika u tačkama ključanja. Destilacija je jednostavan i efektan metod za prečišćavanje otpadnog glicerola sa visokim sadržajem soli i organskih neglicerolnih materija. Prečišćavanjem otpadnog glicerola prostom destilacijom na 120-126 °C postiže se prinos od 141,8 g glicerola/kg glicerolnog ostatka (prinos od 14 %) prihvatljive čistoće od 96,6 %. Ostale karakteristike destilisanog glicerola su: 0,03 % pepela, 1 % vode, 2,4 % organskih neglicerolnih materija i pH 3,5 (Yong i sar., 2001 ). Međutim, destilacija otpadnog glicerola je energetski zahtevna operacija izdvajanja zbog visokog specifičnog toplotnog kapaciteta glicerola (Yong i sar., 2001).

Otpadni glicerol se može prečistiti i metodom razmene jona. Razmena jona je metoda uklanjanja nečistoća, boje i mirisa razmenom jona iz jonoizmenjivačkog materijala (Wall, 2009). Ova tehnika zahteva male količine vode za odvajanje soli od glicerola i ne zahteva isparavanje glicerola. Isahak i sar. (2010) su sproveli eksperimente sa smolama Amberlit IRN-87 i Amberlit 200 kako bi prečistili otpadni glicerol. Nakon analiza prečišćenog glicerola, utvrđeno je da su nečistoće neorganske soli i slobodni joni otklonjeni.

Pored ostalih metoda prečišćavanja, moguća je i primena hemijskih (kisela protonizacija) i fizičkih (filtracija) tretmana. Kod hemijskog tretmana, organske neglicerolne materije iz sirove glicerolske frakcije mogu reagovati sa kiselinom, kako bi se stvorili odgovarajući alkohol i slobodne masne kiseline. Slobodne masne kiseline se dalje mogu otkloniti ekstrakcijom ili dekantovanjem. Određena istraživanja (Ooi i sar., 2001) su pokazala da se hemijskim tretmanom pri nižem pH može smanjiti sadržaj pepela prilikom prečišćavanja glicerola sumpornom kiselinom koncentracije 6 %.

Neki autori (Hazimah i sar., 2003) su objavili da se visoka čistoća glicerola (99,1–99,8 %), uz nizak sadržaj nečistoća (0,11-0,80 % vode, 0,054 % pepela i 0,054 % sapuna), može postići kombinacijom fizičkih i hemijskih tretmana. Postoje i tvrdnje da se visok sadržaj pepela, vode i organskih neglicerolnih materija može otkloniti kombinovanjem hemijskih i fizičkih tretmana tečnom ekstrakcijom, pri čemu se dobija glicerol visoke čistoće (93,34 %) uz nizak sadržaj kontaminenata (0,00045 % pepela i 5,16 % organskih neglicerolnih materija) (Kongjao, 2010). Primenom kombinovanih fizičkih i hemijskih metoda prečišćavanja otpadnog glicerola postiže se jednostavnost izvođenja, visoka efikasnost i, zavisno od načina izvođenja, niska cena. Međutim, prečišćavanje u nekim slučajevima nije ekonomski opravdano i znatno utiče na cenu glicerola (Tan i sar., 2013).

## 2.3 Upotreba (čistog) glicerola

Glicerol je visoko funkcionalan molekul u odnosu na petrohemijski dobijene ugljovodonike, tako da se veliki broj vrednih hemijskih jedinjenja kao što su: 1,3-propandiol, 1,2-propandiol, dihidroksiacetone, vodonik, poligliceroli, ćilibarna kiselina i poliestri može dobiti odgovarajućim hemijskim reakcijama (Brandner i sar., 2009). Katalitičkom oksidacijom glicerola se dobijaju razna jedinjenja, kao što su dihidroksiacetone i gliceraldehid (Demirel i sar., 2005). Glicerol se može koristiti i kao sirovina u proizvodnji makromolekula (Haag i sar., 2000). Kombinacijom glicerola sa nekim drugim jedinjenjima mogu se dobiti neki korisni proizvodi. Na primer, glicerol i etilen glikol, zajedno, mogu da se koriste kao rastvarač za alkalni tretman tkanina (Yang and Verkman, 1997). Može se koristiti i kao dielektrični medijum za neke energetske sisteme (Brown i sar., 1999). Mešanjem sa tečnim gorivima i biomasom može se koristiti kao alternativni energent (Demirbas, 2000). Fermentacijom mešanih kultura može se dobiti mešavina polihidroksialkanoata (Koller i sar., 2005).

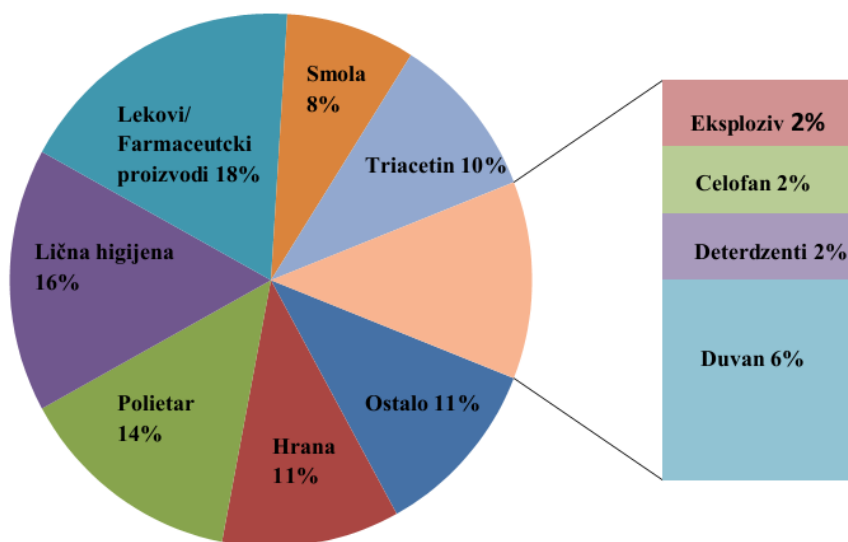
### 2.3.1. Primena glicerola u industriji

Glicerol predstavlja vredan proizvod koji ima širok spektar mogućnosti primene u industriji. Trenutno ima preko dve hiljade raznih primena (Gabriele i Rutger, 2007), posebno u farmaceutskoj, kozmetičkoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji, što je prikazano na slici 2.4. Glicerol je netoksično, jestivo i biorazgradivo jedinjenje, tako da omogućuje značajne ekološko-bezbednosne garancije kao sirovina za novu generaciju proizvoda.

Glicerol se široko koristi u proizvodnji lekova, u medicini i farmaciji, najčešće kao rastvarač lekova, daje pilulama vlažnost i povećava viskoznost tečnih preparata. Dodaje se u sirupe za kašalj, lekove za ušne infekcije, kao nosač antibiotika i antiseptika i kao plastifikator za kapsule lekova. Glicerol je odličan rastvarač joda, broma, fenola, tanina, alkaloida i žive-hlorida. Koristi se kao dodatak lubrikantima i preparatima za negu kože i kose, kao sredstvo koje tonira, daje glatkoću, sjaj i odgovarajuću vlažnost (Ampaitepin i Tetsuo, 2010). Glicerol je glavni dodatak pastama za zube koji onemogućuje očvršćavanje i isušivanje u tubi, tako da se procenjuje da trećina glicerola sa tržišta koja se potroši za proizvodnju lične higijene ode na proizvodnju paste za zube (Shawn, 2008).

U industriji hrane i pića, glicerol se koristi kao rastvarač, sredstvo za zaslađivanje i konzervisanje, u proizvodnji ekstrakata čaja, kafe, đumbira i drugih biljnih materijala. Koristi se kao sredstvo za omekšavanje hleba, kolača, mesa, sira i bombona. Jedini uslovi koje je neophodno da glicerol ispuni za upotrebu u proizvodnji hrane i pića jesu zadovoljenje određenih standarda vezanih za čistoću kao i količinska pogodnost za dati proizvod. Moguća je čak i primena kao dodatka koncentratima u industriji stočne hrane (Cerrate i sar., 2006).

Primenjuje se i za očuvanje svežine duvana i regulaciju vlage duvana kako bi se otklonio neprijatan i iritirajući ukus (Ampaitepin i Tetsuo, 2010). U industriji papira, glicerol se koristi kao plastifikator i kao lubrikant, dok se u tekstilnoj industriji koristi za podmazivanje i omekšavanje prediva i tkanina (Gabriele i Rutger, 2007).



Slika 2.4 Upotreba glicerola u industriji (Gabriele i Rutger, 2007)

### 2.3.2. Hemijska konverzija glicerola do 1,2-propandiola i akroleina

1,2-propandiol (propilenglikol) je bezbojna, viskozna tečnost, bez mirisa i predstavlja značajan hemijski proizvod sa širokom primenom u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, duvanskoj kao i u industriji boja i lakova. U Sjedinjenim Američkim Državama, godišnje se proizvede u količini koja prelazi pola miliona tona (Dasari i sar., 2005).

Perosa i Tundo (2005) su izvodili selektivnu konverziju glicerola u 1,2-propandiol zagrevanjem glicerola i Raney-nikal katalizatora 20 h na 150 °C i uz vodonik pod pritiskom od 10 atm u čeličnom autoklavu. Pri postignutoj selektivnoj konverziji od 12 % dobijeno je 93 % 1,2-propandiola i male količine etanola i ugljenik(IV)-oksida. Grejanjem na 190 °C reakcija se odvijala brže sa konverzijom opsega 70-80 % uz dobijeni etanol i ugljenik(IV)-oksid, a već na 210 °C i bez obzira na još veću brzinu reakcije, selektivnost ka 1,2-propandiolu je pala na 48 %. Otkriveno je da se nivo selektivnosti ka 1,2-propandiolu može poboljšati dodatkom fosfata (Dasari i sar., 2005).

Akrolein, poznat i kao 2-propenal ili akrilni aldehid, najjednostavniji je nezasićeni aldehid (Fan i sar., 2010). Bezbojna je tečnost sa prodornim, neprijatnim, ostrim mirisom, sličnom mirisu goruće masti. Industrijski se proizvodi iz propilena i uglavnom se koristi kao biocid i gradivna komponenta za druga hemijska jedinjenja, kao što je aminokiselina metionin (Dasari i sar., 2005). Koristi se kao intermedijer za sintezu akrilne kiseline i estara akrilne kiseline, kao sredstvo za otklanjanje sluzi u industriji papira i kao mikrobiocid za uljne rezervoare.

Akrolein se može proizvesti od glicerola dehidratacionim procesom uz prisustvo katalizatora. Alhanash i saradnici (2010) su demonstrirali proces dehidratacije glicerola do akroleina u gasnoj fazi uz prisustvo cezijumove soli kao katalizatora. Ova reakcija se odvijala na temperaturi od 275 °C i pritisku od 1 bar. Rezultati su pokazali da katalizator pokazuje visoku početnu aktivnost uz konverziju glicerola od 100 % i selektivnošću od 98 % u odnosu na akrolein. Watanabe i saradnici (2007) su dobili akrolein polazeći od glicerola u vreloj komprimovanoj vodi. Utvrdili su da je brzina razgradnje akroleina bila uvek veća od brzine formiranja akroleina, što se moglo prevazići dodavanjem kiselog katalizatora. Dodatkom kiselog katalizatora i pod superkritičnim uslovima (400 °C i 34,5 MPa) postignut je prinos od 81 % akroleina.

Sprovedena su i određena ispitivanja dehidracije glicerola do akroleina u gasnoj fazi, pri čemu je objavljeno da se proces može izvesti na 300 °C uz prisustvo cirkonijuma kao katalizatora (Bub i sar., 2006). Konverzija glicerola u vodenom rastvoru u akrolein je iznosila 72 %.

### **2.3.3 Hemijska konverzija glicerola do vodonika**

Vodonik ima veliki potencijal kao budući ekološki energent koji bi mogao obezbediti dužu energetska sigurnost. Glicerol se može konvertovati u vodonik na više načina, i to: reformacijom parom, delimičnom oksidacijom i auto-termalnom reformacijom (Fan i sar., 2010). Katalitička reformacija parom je visoko temperaturni endoterman proces kojim se katalizuje reakcija glicerola i vode pri čemu se oslobađa vodonik (Slinn i sar., 2008).

Ustanovljeno je da su optimalni uslovi za proizvodnju vodonika reformacijom glicerola, temperatura od 652 – 702 °C i odnos voda/glicerol 9-12 pod atmosferskim pritiskom. Na 652 °C i pri odnosu voda/glicerol od 12 dobijeno je najviše vodonika: 6,2 mola po molu glicerola (Wang, 2010). Pored toga, vodonik može biti proizveden od glicerola procesom delimične oksidacije pri kome glicerol reaguje sa kiseonikom na sub-stehiometrijskom odnosu (Fan i sar., 2010). Wang X.D. i saradnici (2009) su odredili optimalne uslove pod kojima je ostvarena potpuna konverzija glicerola i prinos vodonika od 78,93-87,31 %, a to je temperatura od 727 do 827 °C, molski odnos kiseonik-glicerol 0,4-0,6 i pritisak od 1 atm.

Auto-termalni reformacioni proces predstavlja kombinaciju delimične oksidacije i parne reformacije smeše glicerola, vazduha i vode u reaktoru (Fan i sar., 2010). Potvrđeno je da je prinos vodonika kod auto-termalne reformacije glicerola veći nego kod prethodno pomenute dve metode (Swami i Abraham, 2006).

## 2.4 Otpadni glicerol kao sirovina za bioprocese

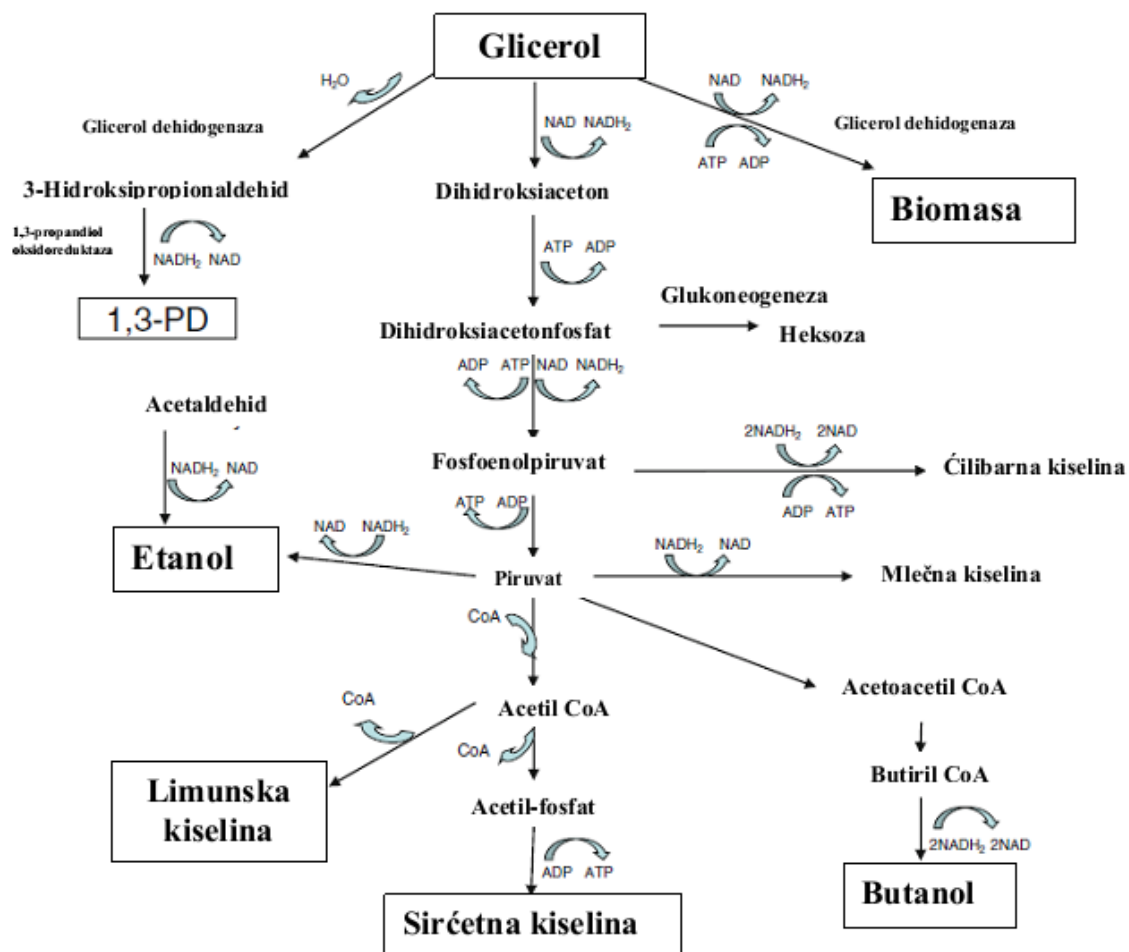
Upotreba glicerola niskog kvaliteta je veliki izazov, jer se ne može direktno koristiti u proizvodnji hrane i farmaceutskih proizvoda. Zbog toga je potrebno istražiti nove mogućnosti primene glicerola, kao što je konverzija u druge značajne i vredne proizvode. Efektivno iskorišćenje ili konverzija otpadnog glicerola u specifične proizvode bi mogla sniziti cenu proizvodnje biodizela (Konstantinović i sar., 2016).

Trenutna istraživanja širom sveta usmerena su ka proučavanju mogućnosti primene otpadnog glicerola kao glavnog izvora ugljenika u hranljivim podlogama za gajenje mikroorganizama u industrijskim fermentacijama. Istraživanja su sprovedena sa ciljem mikrobiološke konverzije otpadnog glicerola u neke industrijski značajne proizvode. Glicerol ima veliku prednost u odnosu na druge sirovine jer je prirodan i jeftin supstrat za biotehnološke procese (Kośmider i sar., 2011; Szymanowska-Powałowska i Białas, 2014).

Glicerol ima veći stepen redukcije u odnosu na druge šećere, a takođe je jeftiniji i lakše dostupan. Konverzijom glicerola do fosfoenol-piruvata ili piruvata stvara se dvostruko više redukujućih proizvoda nego što je slučaj prilikom dobijanja piruvata od glukoze ili ksiloze. Na primer, fermentacijom glicerola do etanola i mravlje kiseline (ili etanola i vodonika) prinos je skoro dva puta veći nego što je slučaj kod fermentacije glukoze gde se tokom biokonverzije skoro polovina glukoze izgubi kao ugljenik(IV)-oksid.

Pored toga, upotreba otpadnog glicerola ublažava kataboličku represiju ugljenikom – efekat glukoze prisutan kod iskorišćenja glukoze. U slučaju ugljениčne kataboličke represije, prisustvo brzo metabolišućeg izvora ugljenika, kao što je to glukoza, inhibira ekspresiju genski kodiranih proteina neophodnih za iskorišćenje alternativnih izvora ugljenika kao što su glicerol, laktoza i drugi (da Silva i sar., 2009a).

Metabolički putevi mikrobiološke razgradnje glicerola prikazani su na slici 2.5, a u tabeli 2.5 dat je pregled rezultata proučavanja mogućnosti biokonverzije otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela u visokovredne proizvode.



Slika 2.5 Konverzija glicerola u značajne proizvode (da Silva i sar., 2009a)



Tabela 2.5 Proizvodi mikrobiološke konverzije otpadnog glicerola

<b>Proizvod</b>	<b>Mikroorganizam</b>	<b>Prinos</b>	<b>Referenca</b>
<b>1,3-propandiol</b>	<i>Citrobacter werkmanii</i> DSM 17579	0,62 mol/mol glicerola	Maru i sar., 2013
	<i>Citrobacter freundini</i> FMCC-B924	0,48 mol/mol glicerola	Maervoet i sar., 2012
	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (modifikovani)	0,66 mol/mol glicerola	Jansen i sar., 2012b
	<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	0,63 mol/mol glicerola	Gonzales i sar., 2005a
	<i>Clostridium butyricum</i> VPI 3266	0,65 mol/mol glicerola	Gonzales i sar., 2005b
	<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	0,63 mol/mol glicerola	Gonzales i sar., 2005a
	<i>Clostridium butyricum</i> VPI 3266	0,65 mol/mol glicerola	Gonzales i sar., 2005b
	<i>Klebsiella pneumonia</i> (bez kapsule)	0,65 mol/mol glicerola	Yang i sar., 2007
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (laktat deficitarna)	0,41 mol/mol glicerola	Zhang i sar., 2006
<i>Klebsiella pneumonia</i> (aldehid-dehidrogenaza inaktivisana)	0,70 mol/mol glicerola	Zhang i sar., 2009	
<b>n-butanol</b>	<i>Clostridium pasteruanium</i> (imobilisan)	0,43 mol/mol glicerola	Wilkens i sar., 2012
	<i>Clostridium pasteruanium</i> ATCC6013	30 g/g glicerola	Taconi i sar., 2009
<b>Etanol</b>	<i>Escherichia coli</i> SY03	1 mol/mol glicerola	Kim i sar., 2011b
	<i>Klebsiella pneumonia</i> (modifikovana)	0,89 mol/mol glicerola	Zhao i sar., 2006
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (modifikovan)	-	Sánchez i sar., 2008
	<i>Kluyvera cryocrescens</i> S26	27 g/l	Choi i sar., 2011
<b>Mlečna kiselina</b>	<i>Escherichia coli</i> AC521	0,9 mol/mol glicerola	Zhang i sar., 2010
<b>Ćilibarna kiselina</b>	<i>Escherichia coli</i> (modifikovana)	0,8 mol/mol glicerola	Metsoviti i sar., 2013
	<i>Basfia succiniciproducens</i> DD1	1,02 g/g glicerola	Scholten i sar., 2009
<b>Limunska kiselina</b>	<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratislavia AWG7	0,33 mol/mol glicerola	Liang i sar., 2010
	<i>Yarrowia lipolytica</i> N15	71 g/l	Kamzolova i sar., 2011
<b>Propanska kiselina</b>	<i>Propionobacterium acidipropionici</i>	0,66 mol/mol glicerola	Ruhal i sar., 2012b
<b>Trehaloza</b>	<i>Propionobacterium freudenreichi</i> podv. <i>shermanii</i> NCIM 5137	391 mg/g biomass	Ruhal i sar., 2012b
<b>H<sub>2</sub></b>	<i>Citrobacter freundii</i> H3	0,94 mol/mol glicerola	Yang i sar., 2011
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	-	Sabourin-Prov i sar., 2009
	<i>Paenibacillus macerans</i>	0,801 mol/mol glicerola	Gupta i sar., 2009
<b>Polihidroksialkanoati</b>	<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	~70%	Ibrahim i sar., 2009
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> NRRL B-14682	30%	Ashby i sar., 2011
<b>Mikrobno ulje</b>	<i>Lentinula edodes</i> sojevi	0,1 g/g biomase	Chatzifragku i sar., 2011
	<i>Aspergillus niger</i> sojevi	0,41 g/g biomase	Imandi i sar., 2007
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	52% sadržaja ulja	Jung i sar., 2011
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	36,5% sadržaja ulja	Chi i sar., 2007

<b>Mikrobno ulje i polinezasićene masne kiseline</b>	<i>Thamnidium elegans</i>	-	Rywinska i sar., 2009
<b>Dokozaheksaenoinjska kiselina (DHA)</b> 22:6 (n-3)	<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	-	Pyle i sar., 2008
	<i>Schizochytrium limacinum</i>	52g/ l-dan	Ethler i sar., 2011
<b>Eikozapentenska kiselina (EPA)</b> 20:5 (n-3)	<i>Pythium irregulare</i>	90 mg/l	Athalye i sar., 2009

Mnoga istraživanja su sprovedena sa ciljem primene otpadnog glicerola kao komponente u podlogama za gajenje bakterija koje proizvode dihidroksiaceton (*Acetobacter sp.*, *Gluconobacter sp.*) (Nabe i sar., 1979; Claret i sar., 1994), *n*-butanol (*Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013TM) (Taconi i sar., 2009), mlečnu kiselinu (*Lactobacillus*) (Prada-Palomo i sar., 2012), propionsku kiselinu (*Propionibacterium*) (Bories i sar., 2004), ćilibarnu kiselinu (*Basfia succiniciproducens* DD1) (Scholten i sar., 2009), polihidroksialkanoate (PHAs) (*Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682) (Ashby i sar., 2011), vitamin B12 (*Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*) (Kośmider i sar., 2012) ili etanol (nepatogeni soj *Kluyvera cryocrescens* S26) (Choi i sar., 2011).

Otpadni glicerol je takođe, korišćen kao izvor ugljenika za gajenje plesni i kvasca u procesima dobijanja limunske kiseline (*Yarrowia lipolytica* N15) (Kamzolova i sar., 2011), sirćetne kiseline i manitola (*Yarrowia lipolytica* LFMB 19) (Chatzifragkou i sar., 2011), fumarne kiseline (*Rhizopus sp.*) (Moon i sar., 2004) i ksilitola (*Candida sp.*) (Arruda i Felipe, 2008).

Određena istraživanja (Pyle i sar., 2008; Zhanyou i sar., 2007) ukazuju da neke jednoćelijske mikroalge (*Schizochytrium limacinum*) mogu proizvesti omega-3 nezasićene masne kiseline (dokozaheksaenoinjska kiselina) fermentacijom otpadnog glicerola.

### 2.4.1 1,3 – propandiol

Kao jedno od boljih rešenja mikrobiološke konverzije otpadnog glicerola u industrijski značajne metabolite pokazala se proizvodnja 1,3-propandiola, koji se može primeniti na različite načine kao vredni hemijski agens za organske sinteze, za proizvodnju biorazgradivih polimera (poliestara, polietara, poliuretana), kozmetike, lubrikanata, lekova i nekih heterocikličnih jedinjenja (Koganti i sar., 2011).

1,3-propandiol se može dobijati hemijski i mikrobiološki ali su poslednjih godina hemijske metode potpuno zamenjene mikrobiološkim (Amaral sar., 2009; Zeng i Biebl, 2002). Objavljeni su rezultati mnogih istraživanja u kojima je proučavana mogućnost fermentacije otpadnog glicerola u 1,3-propandiol (Rossi i sar., 2012; Szymanowska-Powałowska i Białas, 2014; Villegas i sar., 2007; Zong-Ming i sar., 2008).

Ovaj trouglenični diol je bezbojna i viskozna tečnost koja se koristi za dobijanje polimera kao što je to politrimetilen-tereftalat koji na tržištu postepeno zamenjuje polietilenterftalat i poliamide zbog veće otpornosti na istezanje (Fan i sar., 2010). Široko je upotrebljiv u proizvodnji alifatičnih poliestara, ko-poliestara, lepila, premaza, boja za drvo, antifrizu, kalupa i obloga (Yazdani i Gonzalez, 2007).

Proizvodnja 1,3 propandiola je ograničena visokim proizvodnim troškovima, tako da glicerol postaje atraktivna sirovina zbog niske cene i prisutnosti u izobilju (Pachauri i He, 2006). 1,3 –propandiol se može proizvesti od glicerola mikrobnom konverzijom odnosno fermentacijom ili reakcijama dehidroksilacije i hidrogenolize.

Glicerol se može koristiti kao sirovina za proizvodnju 1,3-propandiola fermentacijom, pri čemu se proces odvija u dva koraka enzimskog delovanja. Najpre glicerol-dehidrataza katalizuje konverziju glicerola u 3-hidroksipropionaldehid i vodu. Potom se 3-hidroksipropionaldehid redukuje do 1,3-propandiola odgovarajućom dehidrogenazom (Guerrero-Perez i sar., 2009).

Mu i saradnici (2006) su sprovedli eksperimentalna istraživanja proizvodnje 1,3-propandiola od otpadnog glicerola dobijenog metanolizom od sojinog ulja. Izvodili su šaržne fermentacije otpadnog i čistog glicerola pomoću bakterije *Klebsiella pneumoniae*. Produktivnost 1,3-propandiola od otpadnog glicerola je bila 1,7 g/l/h. Pokazalo se da je 1,3-propandiol u koncentraciji od 51,3 g/l dobijen od otpadnog glicerola iz alkalno katalizovane metanolize sojinog ulja, što je približno 53 g/l dobijenih od otpadnog glicerola iz lipaza katalisanog procesa.

Određena istraživanja su sprovedena i šaržnom fermentacijom glicerola pomoću novoizolovanog soja *Clostridium butyricum* (Papanikolaou i sar., 2000). Za obe kulture, dobijeni konverzioni prinos je bio oko 0,55 g 1,3-propandiola na 1 g glicerola, pri čemu je najviša postignuta koncentracija 1,3-propandiola bila 35-48 g/l.

Objavljeno je da rekombinantni soj *E. coli*, koji je konstruisan transferom DhaB1 (B12-nezavisna glicerol dehidrataza) i aktivacijom DhaB2 od soja *Clostridium butyricum*, produkuje 1,3-propandiol. Ukupan prinos, koncentracija i ukupna produktivnost 1,3-propandiola je bila 1,09 mol/mol, 104,4 g/l, odnosno 2,61 g/l/h respektivno (Tang i sar., 2009). Bakterija *Citrobacter freundii* (DSM 15979) je još jedan potencijalni kandidat za proizvodnju 1,3-propandiola u polikontinualnim uslovima (Jiang i sar., 2014). Laktat-deficijentni mutant *Klebsiella oxytoca* konvertuje otpadni glicerol dobijen u proizvodnji biodizela u 1,3-propandiol, pod polukontinualnim uslovima, uz povećanje prinosa na 0,53 g/mol od 0,41 g/mol i povećanje produktivnosti do 0,83 g/l/h od 0,63 g/l/h. Pod polikontinualnim uslovima, uporedo sa 1,3-propandiolom, stvara se etanol (Cho i sar., 2015).

Osim biosinteze, 1,3-propandiol se može dobiti selektivnom hidrogenolizom glicerola u prisustvu katalizatora i vodonika (Guerrero-Perez i sar., 2009). Selektivnom hidroksilacijom se transformiše hidroksilna grupa iz sredine u tozil-grupu, a potom transformisana grupa se otklanja katalitičkom hidrogenolizom (Pachauri i He, 2006).

Sprovedena su istraživanja hidrogenolize glicerola u 1,3-propandiol koja je katalizovana Ir/Re katalizatorom (Nakagawa i sar., 2010). Rezultati su pokazali da je selektivnost prema 1,3-propandiolu u početnoj fazi dostigla  $67 \pm 3$  % i prinos 1,3-propandiola od 38 % pri konverziji glicerola od 81 %. Wery i saradnici (2002) sprovedli su hidrogenolizu glicerola pomoću Ni/Re katalizatora. Kao rezultat je dobijena smeša od 44 % 1,2-propilenglikola, 5 % 1,3-propilenglikola i 13 % etilenglikola.

## 2.4.2 Dihidroksiaceton

Dihidroksiaceton (DHA) je jednostavan netoksičan šećer sa tri ugljenikova atoma, poznat i kao glicerol sa formulom  $C_3H_6O_3$  (Bauer i sar., 2005). DHA se prvenstveno koristi kao sastojak proizvoda za potamnjenje. Dihidroksiaceton je higroskopni beli kristalni prašak koji ima slatki rashlađujući ukus i karakteristični miris. U kombinaciji sa piruvatom, DHA se prodaje kao atletske nutritivne suplemente za koji se tvrdi da je oralno konzumirani sagorevač masnoće, kao i da povećava mišićnu masu (Ivy, 1998).

Transformacija glicerola u dihidroksiaceton pomoću bakterije *Acetobacter suboxydans* je još jedan primer mogućeg procesa. U toku fermentacije, bakterija proizvodi dihidroksiaceton u prinosima od 75–90 % iz 5–15 % rastvora glicerola. Dihidroksiaceton može biti transformisan daljim dejstvom dihidroksiaceton-kinaze do dihidroksiaceton-fosfata, što služi kao osnovna podloga za neke aldolaze da bi proizveli različite optički aktivne derivate šećera (Zheng-Xiang i sar., 2001).

Mnogi autori su objavili rezultate istraživanja kojima su pokazali da se konverzija glicerola do dihidroksiacetona može uspešno izvesti pri različitim uslovima fermentacije (Adlercreutz, 1986; Bauer i sar., 2005; Bories i sar., 1991). Sprovedena su i određena istraživanja sa sojem bakterije *Klebsiella pneumoniae* (Chevalier i sar., 1990). Utvrđeno je da su putevi aerobnog i anaerobnog metabolizma glicerola različiti. Tokom anaerobnog gajenja, glicerol se konvertuje u dihidroksiaceton pomoću glicerol-dehidrogenaze, a fosforilacijom se dobija dihidroksiaceton-fosfat. Tokom aerobnog gajenja, glicerol se najpre fosforiliše, dajući dihidroksiaceton-fosfat.

### 2.4.3 Limunska kiselina

Dostupno je nekoliko saopštenja o upotrebi otpadnog glicerola za biosintezu limunske kiseline. Korišćenjem otpadnog glicerola pomoću kvasca *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 dobija se istovremeno, pored limunske kiseline, i mikrobno ulje (Papanikolaou i Aggelis, 2003), što nije slučaj kod proizvodnje limunske kiseline od konvencionalnih šećernih sirovina (Papanikolaou i sar., 2008; Papanikolaou i Aggelis, 2009). Kada je izvođena polukontinualna fermentacija otpadnog glicerola pomoću acetat–negativnih mutanata soja *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7, krajnja koncentracija dobijene limunske kiseline je bila 131,5 g/l, što je približno dobijenoj od čistog glicerola (139 g/l). S druge strane, kada je korišćen soj *Y. lipolytica* Wratislavia K1, dobijena je niža koncentracija limunske kiseline (oko 87-89 g/l) i viša koncentracija eritrola (iznad 47 g/l) (Rywińska i sar., 2009), što je u skladu sa rezultatima koje su objavili Rymowicz i saradnici (2008).

U daljim istraživanjima, soj *Y. lipolytica* Wratislavia K1 se pokazao kao superioran u odnosu na druge sojeve za proizvodnju eritrola i ne-limunskih kiselina od otpadnog glicerola, pod optimalnim uslovima konverzije (Rymowicz i sar., 2009). Soj *Y. lipolytica* LGAM S (7)1 je, takođe, pokazao potencijal za konverziju otpadnog glicerola u limunsku kiselinu (Papanikolaou i sar., 2002). Objavljeno je i da *Y. lipolytica* N15, korišćenjem glukoze kao izvor ugljenika, može proizvoditi značajne količine limunske kiseline, čak i preko 98 g/l, dok se gajenjem uz otpadni glicerol može dobiti 71 g/l (Kamzolova i sar., 2011).

### 2.4.4 Ćilibarna kiselina

Ćilibarna kiselina je dikarboksilna kiselina koja se dobija kao međuproizvod ciklusa trikarbonskih kiselina (Gottschalk, 1986). Može se koristiti za proizvodnju sintetičkih smola i biorazgradivih polimera i kao međuproizvod za hemijske sinteze (Scholten i sar., 2009). Lee i saradnici (2001) su objavili rezultate proizvodnje ćilibarne kiseline od glicerola koristeći kulturu *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Proces je izvođen šaržno, pod anaerobnim uslovima. Najviši prinos (1.33 g/g) je dobijen u podlozi sa 6,5 g/l glicerola, pri čemu je izbegnuto stvaranje sirćetne kiseline kao nusproizvoda. Maseni odnos ćilibarne kiseline prema sirćetnoj je bio 25,8:1, što je 6,5 puta više od dobijenih vrednosti kada je kao izvor ugljenika korišćena glukoza.

Veliki broj mikroorganizama ima sposobnost sintetisanja ćilibarne kiseline korišćenjem raznih izvora ugljenika (*Mannheimia succiniciproducens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Escherichia coli*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Carvalho i sar., 2014). Sojevi mikroorganizama kao što su *Basfia succiniciproducens* DD1 (Scholten i sar., 2009) i *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Lee i sar., 2010) mogu je sintetisati korišćenjem otpadnog glicerola kao izvor ugljenika. Razvijen je i kontinualni proces proizvodnje ćilibarne kiseline od otpadnog glicerola pomoću bakterije *Basfia succiniciproducens* DD1 (Scholten i sar., 2009).

#### 2.4.5 Glicerolska kiselina

Glicerolska kiselina se dobija u malim količinama kao sporedni proizvod proizvodnje dihidroxiacetona od glicerola pomoću *Gluconobacter sp.* Korišćenjem soja koji je izolovan iz trule jabuke, prinos glicerolske kiseline je zavisio od prisustva  $\text{CaCl}_2$  kao i drugih jedinjenja u tragovima prisutnih u otpadnom glicerolu. Zapaženo je i da početna pH vrednost od 6,0 stimuliše rast mikroorganizama, kao i da vremenom pH pada do 2,5, što dodatno potpomaže povećanju produkcije glicerolske kiseline (De Ley i sar., 1970).

#### 2.4.6 Propionska kiselina i trehaloza

Propionska kiselina ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ) je univerzalni konzervans dobijen direktno metaboličkim putem sličnom dobijanju ćilibarne kiseline. Sa povećanjem mogućnosti primene propionske kiseline u industriji, odnosno u proizvodnji rastvarača, pesticida, veštačkih začina, termoplastike i farmaceutskih proizvoda, rastu i očekivanja za razvoj biotehnoških procesa njene proizvodnje.

Bakterije *Propionobacterium acidipropionici*, *Propionobacterium acnes* i *Clostridium propionicum* su tri glavna soja bakterija koji proizvode propionsku kiselinu koristeći glicerol. Glicerol je po mnogim autorima obećavajući supstrat u pogledu prinosa i produktivnosti (Himmi i sar., 2000; Ruhal i Choudhury, 2012a).

Trehaloza, redukujući disaharid sa nutritivnim osobinama, koristi se kao stabilizator za terapijske proizvode, kao što su Herceptin 1, Avastin 1, Lucentis 1 i Advat. Bakterija *Propionobacterium freudenreichii* subsp. *shermani* može proizvesti propionsku, mlečnu kiselinu i trehalozu korišćenjem otpadnog glicerola kao izvor ugljenika (Ohtake i Wang., 2011; Ruhali i Choudhury, 2012a).

#### **2.4.7 Otpadni glicerol kao sirovina za dobijanje mlečne kiseline**

Mikroorganizmi mogu da koriste otpadni glicerol kako bi proizvodili organske kiseline, kao što su mlečna, ćilibarna, sirćetna, propionska, fumarna, limunska i druge (Lee i sar., 2010; Prada-Palomo i sar., 2012; Pott i sar., 2013; Ruhali i Choudhury, 2012a; Zhou i sar., 2014). Mlečna kiselina (2-hidroksipropanska kiselina) je najrasprostranjenija karboksilna kiselina koja se javlja u dva izomerna oblika, kao L (+) desnogira i D (-) levogira.

Predstavlja vredno, višenamensko jedinjenje koje se koristi u hemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i polimernoj industriji (Joković, 2010; Okano i sar., 2010). Američka Agencija za hranu i lekove (FDA) je označila mlečnu kiselinu kao bezbednu supstancu za humanu upotrebu (GRAS – Generally Recognized As Safe) pa se ona proizvodi u značajnim količinama i koristi u prehrambenoj industriji (Joković, 2010). Zbog kiselosti i antimikrobnog delovanja, koristi se kao acidulant i konzervans u prehrambenoj i konditorskoj industriji (Rakin i sar., 2007). U farmaceutskoj industriji se koristi kao slobodna kiselina koja poseduje humektantna, antimikrobna i blago-eksfolijantna dejstva i u obliku polimera (Joković, 2010).

Mlečna kiselina može biti proizvedena hemijskom sintezom ili mikrobiološkim procesima. Mikrobiološkim procesima se proizvodi u hranljivim podlogama sa glukozom, saharozom ili škrobom, koji se dobijaju od kukuruza, krompira, ječma i drugih ljudskih namirnica. Zbog toga, proizvodnja mlečne kiseline od otpadnog glicerola bi garantovala industrijsku održivost u smislu nekonkurentnosti sa hranom (Prada-Palomo i sar., 2012). Najpogodniji način dobijanja mlečne kiseline su bakterijske fermentacije zbog brzine izvođenja, mogućnosti izvođenja na jeftinim supstratima, blagih neophodnih uslova i zanemarljiv prinos nusproizvoda (Serna-Cock i Stouvenel, 2005).



Bakterije mlečne kiseline (BMK) su najznačajniji producenti mlečne kiseline. Na osnovu podataka dobijenih molekularnim metodama svrstane su u 16 rodova: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Glubicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Axelsson, 1998). Dugogodišnje korišćenje ovih bakterija, kao i mnogobrojne metaboličke karakteristike, doveli su do značajnih različitih primena ovih mikroorganizama u industriji (Leroy i De Vuyst, 2004).

Objavljeni su rezultati više istraživanja u kojima je proučavana mikrobiološka konverzija otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela u mlečnu kiselinu (Choubisa i sar., 2012; Doi, 2015; Karunakaran i sar., 2014; Murakami i sar., 2016; Vodnar i sar., 2013). Vodnar i sar. (2013) su proučavali mogućnost dobijanja mlečne kiseline pomoću soja plesni *Rhizopus oryzae* NRRL 395 pri čemu su kao izvor ugljenika koristili otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela od sojinog ulja. Najviši prinos mlečne kiseline od 3,72 g/g (48 g/l) glicerola, postignut je u podlozi koja je sadržala 75 g/l otpadnog glicerola. Takođe, pod istim uslovima, zapažen je i dobar mikrobni rast uz postizanje prinosa biomase od 0,72 g/g glicerola.

Objavljeni su i rezultati istraživanja sa bakterijama *Bacillus sp.* (KF781350) i *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactococcus lactis* subsp. *lastrain*. U podlozi koja je sadržala 20 g/l otpadnog glicerola, *Bacillus sp.* (KF781350) je proizveo najviše mlečne kiseline (5,1 g/l) (Karunakaran i sar., 2014), dok su sojevi *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactococcus lactis* subsp. *Lastrain*, u podlozi sa istim sadržajem otpadnog glicerola takođe, proizveo najviše mlečne kiseline, pri čemu su maksimalne postignute koncentracije iznosile 4,37 g/l, odnosno 2,26 g/l, respektivno (Choubisa i sar., 2012).

Poznato je da neki sojevi bakterije *Enterococcus faecalis* mogu koristiti glicerol, odnosno otpadni glicerol kao izvor ugljenika i proizveo mlečnu kiselinu (Doi, 2015; Feng i sar., 2014; Hong i sar., 2009; Mazumdar i sar., 2010; Murakami i sar., 2016; Tian i sar., 2012; Vodnar i sar., 2013). Doi (2015) i Murakami i saradnici (2016) su u podlogama sa otpadnim glicerolom gajili modifikovane sojeve bakterije *E. faecalis*. Bakterijama su pogodovali uslovi za rast i ostvarena produkcija mlečne kiseline bila je čak i viša od 50 g/l (55-58 g/l).

#### 2.4.8 Ksantan

Mikrobni polisaharidi, poznati kao gume, egzopolisaharidi i endopolisaharidi, predstavljaju važnu grupu polimera zbog sposobnosti formiranja gelova i viskoznih rastvora koji se proizvode u industriji (Morris i sar., 2012). Ksantan, odnosno ksantan guma, najznačajniji je mikrobni polisaharid sa svetskom proizvodnjom od približno 30000 t godišnje (Desplanques i sar., 2012). Ovaj polisaharid ima široku komercijalnu primenu u industriji hrane, farmaceutskih proizvoda, kozmetike i poljoprivrednih proizvoda (Moraes i sar., 2010).

Komercijalno dostupna ksantan guma ima relativno visoku cenu zbog glukoze ili saharoze koje se koriste kao jedini izvor ugljenika u njegovoj proizvodnji. Međutim, ksantan se može dobijati i od industrijskog ili poljoprivrednog otpada (Brandão i sar., 2013; Salah i sar., 2011). Generalno, postoji izobilje alternativnih podloga za produkciju industrijskih polisaharida, koje su znatno jeftinije od podloga sa glukozom i drugim šećernim izvorima ugljenika. Upotreba jeftinijih nejestivih sirovina će znatno smanjiti troškove proizvodnje ksantana (Brandão i sar., 2013).

Istraživanja sa sojem *Xanthomonas campestris (mangiferaeindicae 2103)* su pokazala da se ksantan može uspešno dobijati korišćenjem otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela kao izvora ugljenika (Brandão i sar., 2007; 2013). Fermentacija je izvođena u šaržnim uslovima, a viskozitet fermentacione tečnosti je bio 30 % veći nego što je to kod fermentacije sa saharozom. Molekulska masa i prinos dobijenog ksantana od otpadnog glicerola su povećani u odnosu na ksantan dobijen od saharoze na komercijalni način sa  $28,2 \times 10^6$  g/g na  $36,2 \times 10^6$  g/g, odnosno sa 0,21 g/g na 0,36 g/g. Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela se pokazao kao značajna i lako dostupna sirovina za proizvodnju ksantan gume (Brandão i sar., 2013).

#### 2.4.9 *n* – Butanol

Proizvodnja *n*-butanola kao alternativnog goriva je od posebnog značaja jer nudi bolje fizičke karakteristike u odnosu na etanol. Glicerol, kao sporedni proizvod u proizvodnji biodizela, je, takođe, korišćen kao supstrat za produkciju *n*-butanola.

Maksimalna produktivnost od 0,28 g/l/h *n*-butanola je dobijen pomoću Gram pozitivne anaerobne bakterije *Clostridium pasteurianum* sa početnom koncentracijom glicerola u hranljivoj podlozi od 25 g/l na 37 °C (Swati i sar., 2013). Jensen i sar. (2012a; 2012b) su ostvarili produktivnost *n*-butanola od 1,3 g/l/h izvođenjem *in-situ* izdvajanja *n*-butanola.

Kultura *C. pasteurianum* DSMZ 525 se pokazala kao pogodan soj za proizvodnju *n*-butanola na mešovitim kombinovanim podlogama sa glicerolom i hidrolizatima biomase. Dobijanje *n*-butanola se lakše odvija i ne stvara se aceton kao sporedni proizvod. U ovom slučaju ispitivano je dobijanje *n*-butanola na različitim temperaturama, kao i pri različitim koncentracijama supstrata. Najbolja produkcija butanola je ostvarena na temperaturi od 37 °C (Sabra i sar., 2014). Objavljeno je i da se soj *Clostridium acetobutylicum* KF 158795 pokazala kao obećavajući producent *n*-butanola korišćenjem glicerola kao supstrata i da je produkovala 13,57 g/l *n*-butanola za 96 h pod optimalnim uslovima (Yadav i sar., 2014).

#### 2.4.10 Etanol

Etanol se najčešće dobija alkoholnom fermentacijom. Ima mnogo mogućnosti primene, pri čemu se najčešće koristi kao rastvarač, dezinfekciono sredstvo, energent, u proizvodnji alkoholnih pića i za proizvodnju termometara. *Pachysolen tannophilus* (CBS4044) je korišćen za proizvodnju etanola fermentacijom otpadnog glicerola u polukontinualnim uslovima. Ova bakterija je omogućila 50 % v/v potrošnje i konverzije glicerola (Baek i sar., 2011).

*K. pneumoniae* (GEM167) je korišćena za proizvodnju etanola od otpadnog glicerola izvođenjem fermentacija pod šaržnim i polukontinualnim uslovima, pri čemu je ostvarena produktivnost od 0,93 g/l/h (Fakas i sar., 2009). *E. coli* se, takođe, može koristiti za proizvodnju etanola. Kako bi se povećala proizvodnja etanola, određeni sojevi se podvrgavaju modifikaciji, pa je tako soj SY03 konstruisan inaktivisanjem fumarat-reduktaze i fosfat-acetiltransferaze, što je omogućilo produkciju 1 mol etanola i 1 mol vodonika potrošnjom jednog mola glicerola (Yazdani i sar., 2008).

### 2.4.11 Vodonik

Vodonik je jedini energent čijim se sagorevanjem dobija samo voda kao sporedni proizvod, pa samim tim drastično smanjuje emisiju štetnih gasova. Ovo ga čini potencijalno idealnim ekološkim gorivom budućnosti, koje se može dobijati na potpuno ekološki način. Poznato je da se otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela može koristiti kao sirovina za dobijanje vodonika mikrobnim fermentacijama (Priscilla i sar., 2009; Sarma i sar., 2012).

Veliki broj sojeva vrste *Clostridium* mogu proizvoditi vodonik izvođenjem fermentacija u polukontinualnim uslovima. *C. freundii* H3 proizvodi vodonik (0,94 mol/mol) fermentacijom čistog glicerola (Rahul i sar., 2012). U toku fermentacije, termotolerantna *Klebsiella pneumoniae* TR17 formira 20 g/l vodonika u šaržnim i kontinualnim uslovima fermentacije (Yung i sar., 2013). Predtretiran otpadni glicerol može biti fermentisan do vodonika pomoću *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, crvene nesumporne fotosintetske bakterije, koja produkuje 6,1 mol/h/mol glicerola (Pott i sar., 2013).

Objavljeno je da se pomoću soja *Paenibacillus macerans* može postići prinos vodonika od 0,80 mol/mol glicerola, korišćenjem glicerola kao jedinog izvora ugljenika (Saurabh i sar., 2013). Navedeni prinos je niži u odnosu na kasnije postignute sa *R. palustris* i *Enterobacter aerogenes* (Saurabh i sar., 2013). Sprovedena su i istraživanja u kojima su fermentacijom glicerola pomoću *Enterobacter aerogenes* HU-101 dobijeni vodonik i etanol (Ito i sar., 2005). Zbog prisutnih nečistoća iz biodizela, prinos vodonika je bio slabiji kod gajenja sa otpadnim glicerolom nego sa čistim glicerolom. Maksimalna brzina produkcije vodonika je bila 63 mmol/L/h (Ito i sar., 2005).

### 2.4.12 Biopolimeri

Poliglicerolni estri se koriste kao antistatički ili antizamagljivački aditivi, lubrikanti ili plastifikatori. Od glicerola se mogu dobiti izvođenjem selektivne esterifikacije (Clacens i sar., 2002). Poliestri imaju široku primenu, a najčešće se koriste u tekstilnoj industriji, za proizvodnju ambalaže, kao pojačivači elastičnosti gume i plastike itd. Sproveden je veći broj istraživanja mogućnosti i primenljivosti sinteze poliestara korišćenjem glicerola (Kulshrestha i sar., 2005; Nagata i sar., 1996; Stumbe i Bruchmann, 2004; Zhang i sar., 2005).

Koller i saradnici (2005) su proučavali fermentacije u bioreaktorima koristeći osmofilne mikroorganizme, glicerol i hidrolizovanu surutku kao komponente tečne podloge, u cilju proizvodnje polihidroksialkanoata. Nekoliko istraživača je objavilo rezultate istraživanja u kojima su fermentacijom otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela, koji je korišćen kao glavni izvor ugljenika, dobijali biopolimere. Zapaženo je da su biopolimeri dobijani od otpadnog glicerola, i to pri ograničenim količinama izvora azota i fosfata. Amonijum-molibdat i amonijum-sulfat su korišćeni kao izvor azota umesto amonijum-hlorida. Maksimalna produkcija biopolimera 13,3 i 11,2 g/100ml je ostvarena pomoću *Bacillus sp.* i *Pseudomonas sp.* (Sathianachiyara i Devaraj, 2013).

Zapaženo je da *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 produkuje poli-3-hidroksibutirat (PHB) uz različitu koncentraciju glicerola u rasponu od 3 do 9% (v/v). Primećeno je i da se sa povećanjem koncentracije glicerola postepeno smanjivala biomasa, prinos polihidroksialkanoata (PHA), kao i molekulska masa PHB. Količina fermentacione tečnosti je postepeno povećavana do zapremine od 200 l, što je dovelo do povećanjem koncentracije biomase na 23,6 g/l i polihidroksibutirata na 7,4 g/l (Zhu i sar., 2009).

Polihidroksialkanoati (PHA) predstavljaju prirodne unutarćelijske biopolimere koji se dobijaju fermentacijom glicerola kao izvora ugljenika pomoću nekih bakterijskih sojeva. *Halomonas sp.* SA8, bakterija koja je izolovana iz uzoraka zemljišta i sedimenata iz Finske, skladišti unutar ćelije PHA (56 %), koristeći otpadni glicerol kao izvor ugljenika (de Castro i sar., 2014). PHA dobijen fermentacijom otpadnog glicerola pomoću *Pseudomonas mediterranea* (CFBP 5447) je odgovarajućih karakteristika i može se koristiti kao omekšivač u mešavini biopolimera za pakovanje hrane i lekova (Pappalardo i sar., 2014).

Objavljeno je, takođe, da i *Bacillus thuringiensis* EGU45 efikasno produkuje različite PHA pod optimalnim uslovima koristeći otpadni glicerol. U prisustvu visokog sadržaja azota u fermentacionoj podlozi, *Bacillus thuringiensis* EGU45 produkuje PHA u koncentraciji od 1,5-3,5 g/l (Kumar i sar., 2015). Takođe, objavljeno je da neki rekombinantni sojevi *E.coli*, kao što je to soj označen JM109, produkuju biopolimere fermentacijom otpadnog glicerola u šaržnim uslovima (Ganesh i sar., 2015).

#### 2.4.13 Mikrobno ulje

Ulje jednoćelijskih organizama, „Single cell oil“, odnosno mikrobni lipidi, izazvali su veliko interesovanje za primenu u industriji i imaju potencijal da zamene biljne triacilglicerole. Polukontinualni sistemi omogućuju povećanje sadržaja lipida, kao i gustine mikrobnih ćelija. Međutim, eksperimenti sa sojem *Cryptococcus curvatus* i otpadnim glicerolom izvedeni u ovim sistemima su dali negativne rezultate u odnosu na produkciju lipida u šaržnim sistemima (Chatzifragkou i sar., 2011). Približno ista koncentracija ćelija je postignuta izvođenjem procesa u šaržnom sistemu.

Visoka koncentracija ulja, iznad 70 %, dobijena je šaržnim kultivisanjem gljive *Thamnidium elegans* (Chatzifragkou i sar., 2011), dok je 60,7 % lipida dobijeno u polukontinualnom sistemu korišćenjem kvasca *Rhodotorula glutinis* (Saenge i sar., 2011). Trenutno su mnoga istraživanja sa ćelijama gljiva i kvasaca usmerena ka dobijanju visoke koncentracije biomase i lipida u podlogama sa otpadnim glicerolom.

#### 2.4.14 Otpadni glicerol kao dodatak stočnoj hrani

Korišćenje otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela kao dodatka hrani za životinje, posebno je atraktivno zbog visoke energetske vrednosti, kao i visoke stope usvajanja. Ova mogućnost primene postaje sve popularnija zbog stvaranja velike količine viška otpadnog glicerola, ali i zbog porasta cene kukuruza (Kerr i sar., 2007; Yang i sar., 2012).

Mnoga istraživanja su fokusirana na energetske i hranjive vrednosti, kao i na učinak otpadnog glicerola u stočnoj hrani. Svarljiva energija otpadnog glicerola kod 85 % uzoraka je bila u opsegu od 14,9-15,3 MJ/kg, dok je metabolička energija bila u opsegu od 13,9-14,7 MJ/kg (Lammers i sar., 2008). Međutim, neophodno je imati u vidu prisustvo potencijalno opasnih nečistoća u otpadnom glicerolu iz proizvodnje biodizela, kao što su kalijum, koji može da izazove ovlaživanje perja ili poremećaj balansa elektrolita u ishrani piladi (Cerrate i sar., 2006), i metanol koji je toksičan (Cerrate i sar., 2006; Lammers i sar., 2008). Višak glicerola u ishrani životinja može normalizovati fiziološki metabolizam (Yang i sar., 2012).

Kao dodatak stočnoj hrani, otpadni glicerol je korišćen u ishrani preživara i nepreživara. Postignuti su značajni rezultati, posebno kod nepreživara kao što su svinje, kokoši nosilje i tovna pilad. Za nepreživare, otpadni glicerol je odličan izvor energije, što pokazuje metabolička energija kod tovne piladi, kokoši nosilja i krmača (15,2 MJ/kg, 15,9 MJ/kg i 13,4 MJ/kg, respektivno) (Kerr i sar., 2007) i kod tovnih prasadi (15,9 MJ/kg azot-korigovano) (Lammers i sar., 2008).

Otpadni glicerol dodat u hranu za prasad do 10 % od suve materije može imati pozitivan efekat na karakteristike tova. Upotreba glicerola za ishranu svinja nije imala značajan uticaj na kvalitet mesa (Schieck i sar., 2010). U ishrani jagnjadi, dodavanjem čak do 15%, a kod mesnih koza od 5% mase hraniva može imati pozitivan efekat na randman klanja (Hampy i sar., 2008). Dodatak prečišćenog glicerola do 15 % od suve materije u hrani za mlečne krave je moguće bez štetnog efekta na unos hrane, produkciju i prinos mleka (Donkin i sar., 2009).

#### **2.4.15 Otpadni glicerol kao sirovina za dobijanje antibiotika**

Nedavne studije ukazuju na mogućnost korišćenja otpadnog glicerola kao izvora ugljenika za mikrobiološku proizvodnju antibiotika. Zeng i sar. (2013) su istraživali mogućnost produkcije glikopeptidnog antibiotika vankomicina pomoću bakterije *Amycalatopsis orientalis* KMU-VS01 na hranljivoj podlozi sa otpadnim glicerolom. Pored otpadnog glicerola, u osnovnoj podlozi su, kao izvori ugljenika, korišćeni glukoza, fruktoza, maltoza, saharoza, dekstrin i rastvorljivi skrob. Otpadni glicerol je bio najefikasniji izvor ugljenika za rast bakterije i produkciju vankomicina. Optimalna koncentracija glicerola u podlozi bila je 40-60 g/l. Maksimalna koncentracija vankomicina od 7,61 g/l i biomase od 15,8 g/l postignuta je nakon 120 h fermentacije. Prinos produkovanog vankomicina je bio 3,5 puta veći u medijumu koji sadrži otpadni glicerol u odnosu na osnovnu podlogu. Rezultati pokazuju da je otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela dobar potencijalni izvor ugljenika za proizvodnju vankomicina kulturom *Amycalatopsis orientalis* KMU-VS01 (Zeng i sar., 2013).

Shin i saradnici (2011) su potvrdili da se otpadni glicerol može uspešno koristiti kao alternativni izvor ugljenika u proizvodnji cefalosporina C pomoću bakterije *Acremonium chrysogenum* M35. U industrijskom procesu fermentacije za proizvodnju cefalosporina koristi se glukoza, saharoza i biljna ulja kao glavni izvori ugljenika (Revin i sar., 1991). Međutim, bilo je neophodno da se razviju efikasnije metode proizvodnje cefalosporinskog antibiotika sa jeftinijim izvorima ugljenika, kao što je otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela (Brakhage i sar., 2005). Prethodne studije su pokazale da tokom rasta bakterije *Acremonium chrysogenum* M35 na hranljivoj podlozi sa 3 % ulja pirinča i metioninom, kao izvorima ugljenika i azota, postoji povećana proizvodnja cefalosporina C za oko 4,5 g/l odnosno na 7,4 g/l (Chae i sar., 2006).

Shin i saradnici (2011) istraživali su uticaj otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela kao izvora ugljenika u proizvodnji cefalosporinskog C antibiotika pomoću *Acremonium chrysogenum* M35. Dodatak 4 % otpadnog glicerola u osnovni medijum povećava proizvodnju cefalosporina C od 0,72 do 4,92 g/l. Otpadni glicerol se troši sporije nego glukoza i dovodi do manje kataboličke represije. Rezultati istraživanja ukazuju da se otpadni glicerol može uspešno koristiti kao alternativa za metionin, biljna ulja i druge izvore ugljenika, kako bi se povećala proizvodnja cefalosporina C na industrijskom nivou (Shin i sar., 2011).

Većina aktinomiceta ima sposobnost korišćenja glicerola kao izvora ugljenika (Jonsbu i sar., 2002). Bakterija *Streptomyces hygroscopicus* podjednako dobro raste i produkuje antibiotike na podlogama sa čistim, ali i sa otpadnim glicerolom (Gesheva i sar., 2005; Ilić i sar., 2013). Izvor ugljenika značajno utiče na primarni i sekundarni metabolizam, odnosno na rast, razvoj i produkciju sekundarnih metabolita (Ilić i sar., 2013; Santos i sar., 2013).

Kultura bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 izolovana je 1974. godine iz uzorka zemlje iz Vojvodine (Vučetić i sar., 1991). Izolovani soj proizvodi antibiotske supstance koje deluju inhibitorno na Gram pozitivne bakterije, kvasce i gljive. Pri fermentaciji u tečnoj podlozi, ovaj soj proizvodi smešu antibiotika, pri čemu su izolovana i identifikovana tri antibiotika: polietarski nigericin, polienski heksaen H-85 i makrodiolidni azalomycin B (elaiofilin) (Vučetić i sar., 1991, 1994).



Pored izvora ugljenika, značajan uticaj na rast i produktivnost (biosintezu antibiotika) ima i izvor azota (aminokiseline, neorganske soli, organske supstance). U većini slučajeva, postoji korelacija između produkcije sekundarnih metabolita i porasta biomase, tako da je za optimalnu produkciju antibiotika neophodan optimalni rast biomase. Istraživanja sa sojem *S. hygroscopicus* CH-7 su pokazala da derivati izatina, odnosno Schiff–ove baze, kao izvor azota, imaju stimulatивно dejstvo na rast i produkciju antibiotika (Ilić, 2010; Ilić i sar., 2010). Derivati izatina poseduju različite biološke aktivnosti kao što su antimikrobna, antivirusna, antikancerogena, anti-HIV i druge (Konstantinović, 2007; Konstantinović i sar., 2008; Premanathan i sar., 2012; Sriram i sar., 2006).

#### **2.4.16 Otpadni glicerol kao izvor ugljenika za gajenje mikroalgi**

Mikroalge se danas koriste za dobijanje raznih komercijalnih proizvoda. Određeni sojevi algi, kao što su: *Anabaena sp.*, *Botryococcus braunii.*, *Scenedesmus acutus.*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Cladophora sp.*, *Hydrodictyon sp.*, *Neochloris sp.*, *Porphyridium sp.*, *Spirulina maxima.*, *Synechocystis sp.*, i *Tetraselmis sp.*, predstavljaju veliki potencijal za primenu u različitim granama industrije (Svirčev, 2005).

Komercijalna proizvodnja algi u prehrambenoj industriji je sve aktuelnija, a najčešće se koriste mikroalge iz rodova *Chlorella*, *Scenedesmus* i cijanobakterija *Spirulina sp.* (Blaženčić; 2000). Značajna upotreba biomase algi u prehrambenoj industriji je u cilju izolovanja alginata, agara, karagenana i drugih supstanci koje mogu rastvore činiti viskoznom ili želatinoznom. Navedene supstance se koriste kao aditivi (modifikatori, zgušnjivači, konzervansi) u tehnološkim postupcima održavanja konzistencije proizvoda, ugušćivanja, stabilizacije nekih svojstava proizvoda i konzerviranja (Svirčev, 2005).

Zahvaljujući sposobnosti mikroalgi da proizvode biološki aktivna jedinjenja i druge supstance od velikog značaja za ljudsko zdravlje, ovi mikroorganizmi sve češće postaju predmet opsežnih farmakoloških istraživanja. Preparati pripremljeni od alge *Scenedesmus obliquus* su pokazali dobra svojstva u slučajevima gde je bilo potrebno ubrzati regeneraciju tkiva.

Medicinskim istraživanjima je konstatovano da biomasa mikroalge roda *Chlorella* ima antitumorsku aktivnost. Kuproflorofil izolovan iz *Chlorella sp.* u 98,5 % slučajeva (*in vitro*) uništava mutantne sojeve *Streptococcus sp.*, najčešće izazivače bolesti zuba (Spolaore i sar., 2006; Svirčev, 2005).

Kozmetičko tržište se sve više opredeljuje za prirodne preparate sa antioksidativnim svojstvima. Biomasa mikroalgi i cijanobakterija je idealni konstituent u proizvodnji finih krema za lice zbog visokog proteinskog sadržaja, bogatstva prirodnih pigmenata i vitamina. Najčešće se koriste *Arthrospira sp.* i *Chlorella sp.* (Spolaore i sar., 2006).

Mikroalge imaju ključnu ulogu u akvakulturi i u prečišćavanju otpadnih voda. Mikroalge koje se najčešće nalaze u otpadnim vodama sa visokom koncentracijom organskih jedinjenja, najčešće pripadaju rodovima *Euglena* i *Chlamydomonas*. U cilju uklanjanja hlora, kadmijuma, i bakra iz industrijskih otpadnih voda, predložena je zelena mikroalga *Scenedesmus incarnatus*, prilikom biosorpcije selena najefikasniji soj je zelena alga roda *Chlorella* KR-1, prilikom usvajanja kadmijuma pokazala se efikasna morska alga *Tetraselmis suecica* (Svirčev, 2005).

Jednostavne ili primitivne alge (mikroalge) se mogu iskoristiti za proizvodnju različitih biorazgradivih goriva, kao što su: metan, etanol, biodizel, prirodna ulja i vodonik (Colleta i sar., 2011; Danilović i sar., 2014; Huesemann i Benemann, 2009; Kim N.J. i sar., 2011; Raya i sar., 2015). Biomasa mikroalgi sadrži tri osnovne komponente: ugljene hidrate, proteine i ulja. Za proizvodnju biodizela vrlo je važna frakcija prirodnog ulja koja sadrži triacilglicerole. Mikroalge mogu sadržati triacilglicerole i više od 60 % od svoje mase (Danilović i sar., 2014; Taberner i sar., 2012).

Otpadni glicerol se može uspešno koristiti za proizvodnju dokozaheksaenoinske kiseline (DHK) fermentacijom alge *Schizochytrium limacinum* (Pyle, 2008; Pyle i sar., 2008; Zhanyou i sar., 2007), koja je prvi put predstavljena nakon izolacije iz uzorka morske vode sa Mikronezijskog ostrva Yap 1994. godine (Honda i sar., 1998). Istraživanja su pokazala da ova alga ima drugačije osobine u odnosu na pripadnike iste vrste, kao što su oblik ćelije, drugačije zoospore i usvajanje izvora ugljenika (Honda i sar., 1998).

Dalja istraživanja su pokazala da *S. limacinum* može biti značajan producent dokozaheksaenoinske kiseline (Nekahara i sar., 1996; Yaguchi i sar., 1997). DHK je važna omega-3 polinezasićena masna kiselina za koju se pokazalo da ima korisne efekte kod prevencije kardiovaskularnih bolesti, kancera, šizofrenije i Alchajmerove bolesti (Branchey and Branchey, 2008; Hering i sar., 2007; Masson i sar., 2007; Simopoulos, 1999). Takođe, ima važnu ulogu kod razvoja mozga odojčadi (Innis, 2007).

Sinteza omega-3 masnih kiselina se odvija u dve faze. U prvoj fazi dolazi do sinteze masnih kiselina kratkog lanca od acetata. U većini slučajeva, dobijena masna kiselina kraćeg lanca je oleinska kiselina (C 18:1,  $\omega$ -9) (Pyle, 2008). Nakon sinteze oleinske kiseline, dolazi do stvaranja polinezasićenih masnih kiselina dužeg lanca tokom niza reakcija dehidratacije i elongacije (Pyle, 2008).

Vrlo mali broj mikroorganizama ima sposobnost da prirodno stvara omega-3 masne kiseline. Više biljke i životinje nemaju tu sposobnost. Neki organizmi, uključujući i ljude, mogu da sintetišu vrlo male količine eikozapentenske ili dokozaheksaenoinske kiseline unošenjem alfa-linolenolenske kiseline, ali je konverzija veoma mala (Innis, 2007).

Komercijalna sirovina iz koje se dobijaju omega-3 masne kiseline je riblje ulje, ali česti problemi koji se javljaju su neprijatan miris, prisustvo teških metala i ograničenost snabdevanja (Barclay i sar., 1994; Innis, 2007). Ribe prirodno ne proizvode omega-3 masne kiseline, već ih unose ishranom, konzumirajući alge, mikroorganizme i planktone (Simopoulos, 1999).

Razvoj proizvodnje DHK od otpadnog glicerola pomoću mikroalgi predstavlja odličnu priliku za obezbeđenje alternativnog izvora omega-3 masnih kiselina (Chin i sar., 2006). Pored toga, količine otpadnog glicerola bi se znatno smanjile.

Generalno, rezultati istraživanja su pokazali da je otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela pogodan izvor ugljenika za fermentaciju algi. Gajenjem na otpadnom glicerolu, alge su proizvele znatnu količinu omega-3 nezasićene masne kiseline (dokozaheksaenoinska kiselina) (4,91 g/l), što predstavlja veliki potencijal otpadnog glicerola kao sirovine za omega-3 dodatke ishrani (Pyle i sar., 2008).

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1 Hemikalije

Za izradu ove disertacije, od hemikalija korišćeni su:

- $\text{CaCO}_3$ ,
- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ,
- $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,
- $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ,
- EDTA,
- $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ,
- $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- KOH,
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ,
- $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ,
- $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ,
- $\text{MoO}_3$ ,
- NaCl,
- $\text{NaNO}_3$ ,
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ,
- agar,
- etil-acetat,
- glicerol,
- glukoza,
- hloroform,

- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon,
- 5-hloroizatin-3-hidrazon,
- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon,
- izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon,
- izatin-3-hidrazon,
- izatin-3-tozilhidrazon,
- metanol,
- *n*-butanol,
- otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela od suncokretovog ulja,
- otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela od repičinog ulja,
- pepton i
- triptofan.

Sve hemikalije, osim otpadnog glicerola i derivata izatina, bile su farmaceutske čistoće (Sigma Aldrich) i korišćene su bez daljeg prečišćavanja.

Od materijala, za pripremu podloga su korišćeni i Ekstrakt kvasca (Torlak, Beograd), Mesni ekstrakt (Torlak, Beograd), gotova mešavina za pripremu MRS podloge (Torlak, Beograd) i odmašćeno sojino brašno (Sojaprotein, Bečej).

## **3.2 Mikroroganizmi**

### **3.2.1 Bakterija *Enterococcus faecalis* MK3-10A**

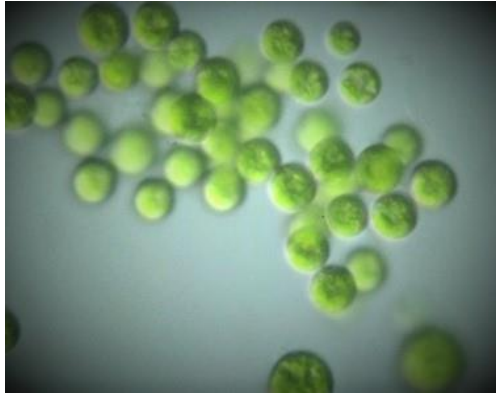
Za biosintezu mlečne kiseline na podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom, korišćen je soj mlečnokiselinske bakterije *Enterococcus faecalis* MK3-10A, dobijen izolacijom iz sedam meseci starog uzorka kajmaka (Joković, 2010). Kultura je čuvana u frižideru (+4° C) na MRS agaru a pre svake serije eksperimenata, aktivirana je uzastopnim presejavanjem na 48 h u tečnoj MRS podlozi (Torlak, Beograd). Skladištenje kulture je vršeno u frižideru na MRS agaru i temperature od +4° C.

### **3.2.2 Bakterija *Streptomyces hygroscopicus* CH-7**

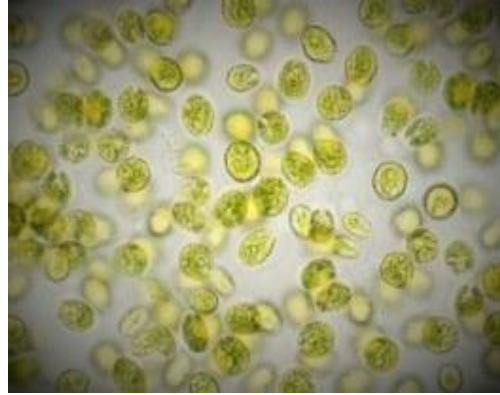
Biosinteza antibiotika na podlogama sa otpadnim glicerolom izvođena je pomoću soja bakterije - aktinomicete *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 (NCAIM(P) B-001336 JX429997.1) iz kolekcije Grupe za mikrobiološku hemiju Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu. Kultura *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 izolovana je 1974. godine iz uzorka zemlje iz Vojvodine (Vučetić i sar., 1991). Za zasejavanje je korišćen inokulum star 48 h, koji je pripremljen u OSP bujonu (osnovna podloga sa sojom) posle više uzastopnih presejavanja na OSP agru, koji se koristi i za čuvanje kulture (+4° C).

### **3.2.3 Jednoćelijske alge izolovane iz slatkovodnih bara**

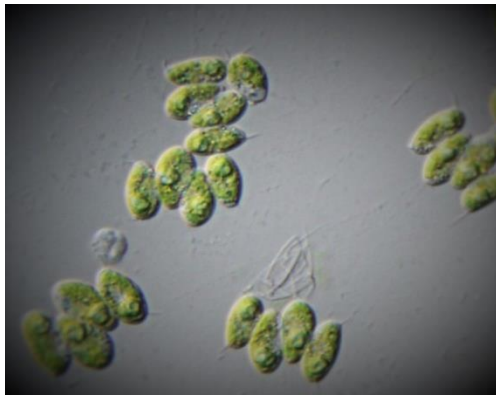
Za proizvodnju ulja korišćena su četiri izolovana soja mikroalgi, identifikovanih kao pripadnici rodova: *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* (slika 3.1). Sojevi su izolovani iz uzoraka vode slatkovodnih bara iz okoline Leskovca u Laboratoriji za mikrobiologiju i prehrambene tehnologije, Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, 2012. godine.



a)



b)



c)



d)

Slika 3.1 Mikroskopski izgled izolovanih jednoćelijskih algi: a) *Chlorococcum sp.*, b) *Chlorella sp.*, c) *Desmodesmus sp.* i d) *Scenedesmus sp.* (foto Mikro-Lab TFL 2012., 60X)

### 3.3 Hranljive podloge

#### 3.3.1 Osnovne podloge za gajenje korišćenih mikroorganizama

Za gajenje mlečnokiselinske bakterije *Enterococcus faecalis* MK3-10A je korišćen MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) bujon (pH 6,4) (Torlak, Beograd) sledećeg sastava (g/l):

Pepton	10,0
Mesni ekstrat	10,0
Ekstrat kvasca	5,0
Glukoza	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
CH <sub>3</sub> COONa	5,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5
MnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2

Priprema se vrši sterilizacijom prethodno rastvorenih 55,8 g suve podloge u 1000 ml hladne destilovane vode.

Soj bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 (NCAIM (P) B-001336) je gajen i čuvan na OSP agru i bujonu (pH 6,9) sledećeg sastava (g/l):

Glukoza	15,0
Odmašćeno sojino brašno	10,0
(Sojaprotein, Bečej) (6% masti)	
CaCO <sub>3</sub>	3,0
NaCl	3,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	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 (za čvrste podloge)	15,0

Nakon pripreme, osnovna podloga sa sojom je sterilisana u autoklavu (20 min, 120°C).



Za izolaciju i gajenje izolovanih sojeva slatkovodnih mikroalgi korišćena je tečna BBM podloga (Bolds Basal Medium) (pH 6,6) sledećeg sastava (g/l):

NaNO <sub>3</sub>	0,249
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,025
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,072
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
NaCl	0,025
EDTA	0,16
KOH	0,077
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,012
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,028
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,019
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,004
MoO <sub>3</sub>	0,002
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,004
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,001

Za pripremanje BBM podloge, korišćeni su rastvori svih komponenti, ne stariji od 2 dana, u koncentracijama zadatim po uputstvu za pripremu podloge (Stein, 1980). Za pripremu čvrste podloge je dodavan agar (15 g/l), a nakon pripreme, podloga je sterilisana u autoklavu (121 °C; 15 minuta).

### 3.3.2 Podloge izmenjenog sastava

U cilju utvrđivanja uticaja otpadnog glicerola kao izvora ugljenika na mikrobnii rast i biosintezu mlečne kiseline (*Enterococcus faecalis* MK3-10A), antibiotika (*Streptomyces hygroscopicus* CH-7) i ulja algi (izolovani sojevi jednoćelijskih slatkovodnih algi) u osnovne podloge (MRS i OSP), umesto konvencionalnog izvora ugljenika (glukoza), kao i u podloge u kojima nije predviđen sadržaj izvora ugljenika (BBM), dodavan glicerol.

Korišćen je otpadni neprečišćeni glicerol iz proizvodnje biodizela od suncokretovog i repičinog ulja, kao i čist glicerol (Sigma Aldrich, 99,5 %). Otpadni glicerol dobijen je u Laboratoriji za hemijsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta u Leskovcu.

U cilju praćenja produkcije antibiotika pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, osim izvora ugljenika, menjan je i izvor azota. Umesto sojinog brašna kao izvora azota u osnovnoj podlozi, dodavane su izatinske Schiff-ove baze kombinovane sa aminokiselinom triptofanom, kao i samo triptofan.

Korišćeni su sledeći derivati izatina: izatin-3-tozilhidrazon, izatin-3-hidrazon, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon, 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon i 5-hloroizatin-3-hidrazon. Izatinske Schiff-ove baze su sintetisane u otpadnom glicerolu po postupku koji je opisan u poglavlju 3.4.1.

## 3. 4 Metode

### 3.4.1 Sinteza derivata izatina u otpadnom glicerolu

Korišćeni derivati izatina (izatin-3-tozilhidrazon, izatin-3-hidrazon, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon, 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon i 5-hloroizatin-3-hidrazon), sintetisani su reakcijom ekvimolskih količina izatina i komponenti amina u otpadnom glicerolu dobijenom u proizvodnji biodizela od suncokretovog ulja, kao zelenom rastvaraču, u Laboratoriji za organske hemijske tehnologije Tehnološkog fakulteta u Leskovcu.

Iz otpadnog glicerola dobijenog iz proizvodnje biodizela od suncokretovog ulja, koji je korišćen za sintezu derivate izatina, uklonjen je višak metanola destilacijom. Nakon destilacije, kiselost je podešena na pH 5, dodavanjem fosforne kiseline (85 %). Neorganske soli, nastale u ovoj fazi, uklonjene su centrifugiranjem (15 min na 400 min<sup>-1</sup>).

### **3.4.2 Izolacija mikroalgi iz uzoraka vode slatkovodnih bara**

Za izolaciju slatkovodnih mikroalgi, korišćeni su uzorci vode iz slatkovodnih bara (okolina Leskovca), za koje je pretpostavljeno da ih sadrže u većem broju i koncentraciji. Izolacija slatkovodnih mikroalgi izvođena je primenom metode serijskog razblaženja i konbinovanjem sa metodom izolacije na agarnim pločama.

Metoda serijskog razblaženja zasnovana je na izvođenju serija razblaženja pri čemu su uzorci većeg razblaženja presejavani u tečnu, kao i na čvrstu podlogu. Nakon inkubacije na 24 °C u toku 15 dana, pojedinačne kolonije koje su bile čiste (monokultura) prenošene su na nove čvrste i tečne podloge u cilju dobijanja unialgalne kulture. Uzorci vode sa algama, najpre su zasejavani u 300 ml BBM podloge, a potom i na agarne ploče.

### **3.4.3 Izvođenje fermentacije sa sojem *Enterococcus faecalis* MK3-10A**

Fermentacija sa sojem *Enterococcus faecalis* MK3-10A je izvođena pod anaerobnim uslovima (bez mućkanja) u erlenmajerima od 500 ml (300 ml podloge), koji su držani u inkubatoru na temperaturi od 28 °C. Kao inokulum je korišćena kultura stara 48 h, dodavana u količini od 2 % od ukupne zapremine fermentacione tečnosti. Pod sterilnim uslovima, na svaka 2 h, uzorkovano je po 10 ml fermentacione tečnosti za merenje mikrobnog rasta (OD 620 nm), koncentracije glukoze, glicerola i produkovane mlečne kiseline u toku procesa fermentacije koji je praćen 24 h.

### **3.4.4 Izvođenje fermentacija sa sojem *Streptomyces hygroscopicus* CH-7**

Fermentacije sa sojem bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 izvođene su u erlenmajerima od 500 ml (300 ml podloge), uz mućkanje ( $170 \text{ min}^{-1}$ ) (slika 3.2) na temperaturi od 28 °C toku 168 h (8 dana), pri čemu je na svaka 24 h, pod sterilnim uslovima, uzorkovano po 10 ml fermentacione tečnosti za analize.

Za inokulisanje, korišćena je kultura starosti 48 h, koja je dodavana u količini od 2 % računato na ukupnu zapreminu fermentacione tečnosti. Istraživanjima u kojima je proučavan uticaj starosti inokulima na produkciju antibiotika, utvrđeno je da se maksimalna produkcija postiže sa inokulumom starim 48 h (Elibol i sar., 1995; Ilić, 2010).



Slika 3.2 Gajenje bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7

### 3.4.5 Gajenje mikroalgi u podlogama sa sa glicerolom

Pri konstantnom osvetljenju, tokom 30 dana, gajene su izolovane jednoćelijske alge u 1000 ml BBM podloge, na rotacionoj mućkalici ( $140 \text{ min}^{-1}$ ), na temperaturi od  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (slika 3.3). U BBM podlogu je dodavan čist i otpadni glicerol, dobijen proizvodnjom biodizela iz suncokretovog i repičinog ulja, u količini od  $15 \text{ g/l}$ . Inokulisano je tako da je vrednost apsorbance, merene na  $\lambda = 620 \text{ nm}$ , nakon zasejavanja iznosila približno  $0,05$  (Reda i sar 2011).

Rast algi praćen je spektrofotometrijski, merenjem optičke gustine ( $OD_{620}$ ), a koncentracija suve biomase je određena po završetku procesa, nakon ulaska algi u stacionarnu fazu. Za određivanje mikrobnog rasta i koncentracije glicerola, izvođeno je uzorkovanje po 3 ml fermentacione tečnosti pod sterilnim uslovima na svaka tri dana (72 h).



Slika 3.3 Gajenje mikroalgi

## 3.5 Analitičke metode

### 3.5.1 Praćenje mikrobnog rasta

Mikrobni rast kulture *Enterococcus faecalis* MK3-10A i izolovanih slatkovodnih mikroalgi (*Chlorococcum*, *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus*), praćen je spektrofotometrijski na  $\lambda = 620$  nm, korišćenjem Cole Parmer 2100 UV/VIS spektrofotometra. U velikom broju objavljenih istraživanja, rast algi praćen je na  $\lambda = 680$  nm (Reda i sar., 2011; Zhang i sar., 2014).

Međutim, izvođenjem probnih fermentacija, čiji rezultati nisu prikazani, utvrđeno je da nečistoće iz otpadnog glicerola stvaraju smetnje prilikom merenja, a dobijane vrednosti nisu bile realne, pa je zbog toga rast biomase algi praćen na  $\lambda = 620$  nm, na kojoj je takođe moguće efikasno pratiti mikrobni rast (Held, 2011). Dok su alge izolovane, prečišćavane i gajene u podlogama za izolaciju, izvođena su paralelna merenja apsorbanci na 680 i 620 nm, pri čemu je ustanovljeno da je jedina razlika u tome što su vrednosti dobijane na 680 nm za oko 25 % više.

Rast bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 je praćen određivanjem koncentracije suve biomase (SBM). SBM je određivana sušenjem vlažne biomase, dobijene centrifugiranjem ( $2000 \text{ min}^{-1}$ ; 5 min) 10 ml uzorka fermentacione tečnosti, na  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  do konstantne mase. Merenje apsorbance ( $\lambda = 620$  nm) fermentacione tečnosti nije bilo moguće zbog pojave i rasta kolonija koje se brzo talože. Veličina kolonija, zavisno od sastava hranljive podloge i uslova rasta, može biti 0,3-4 mm.

### 3.5.2 Određivanje koncentracije glicerola, mlečne kiseline i glukoze

Promena koncentracija glicerola, glukoze i mlečne kiseline određivana je primenom HPLC metode. Uzorci fermentacione tečnosti (10 ml) su najpre centrifugirani (20 min.,  $3000 \text{ min}^{-1}$ ), supernatant je izdvajan odlivanjem, a potom filtriran kroz mikrofiltere sa porama veličine  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ . Za razdvajanje komponenti, korišćena je kolona Aminex HPX-87H (7,8 x 300 mm, Biorad Laboratories) na hromatografu Agilent 1100 Series. Nakon nanošenja  $20 \text{ }\mu\text{l}$  uzorka, za eluiranje je korišćen rastvor sumporne kiseline koncentracije 5mM na temperaturi od  $50^\circ\text{C}$ .

Protok eluenta je bio 0,6 ml/min. Glicerol, glukoza i mlečna kiselina su detektovani pomoću IR detektora na osnovu retencionog vremena standardnih rastvora čistog glicerola, glukoze i mlečne kiseline, a koncentracije su izračunate na osnovu standardnih prava.

### 3.5.3 Određivanje koncentracije antibiotika

Koncentracija antibiotika heksaena H-85 i azalomicina B (elaiofilin) je određivana spektrofotometrijski (Perkin-Elmer Lambda 15 UV/ VIS spektrofotometar) na  $\lambda = 364$  nm, odnosno  $\lambda = 252$  nm. Ekstrakcija heksaena H-85 iz fermentacione tečnosti je rađena *n*-butanolom (1:4), a azalomicina B etil-acetatom (1:2). Smeša fermentacione tečnosti i organskog rastvarača je mućkana (Vortex) nakon čega su odvajani *n*-butanolni i etil acetatni slojevi.

Apsorbanca butanolnog ekstrakta je merena na  $\lambda = 364$  nm a koncentracija heksaena H-85 izračunata je po formuli (Karadžić i sar., 1991):

$$\gamma (\mu\text{g/ml}) = A_{364} \cdot 66,7$$

pri čemu je  $A_{364}$  – izmerena apsorbanca na 364 nm.

Koncentracija azalomicina B, određivana je merenjem apsorbance na 252 nm i izračunavanjem po formuli (Arai, 1960):

$$\gamma (\mu\text{g/ml}) = A_{252} \cdot 25,3$$

pri čemu je  $A_{252}$  – izmerna apsorbanca na 252 nm.

### 3.5.4 Određivanje sadržaja ulja algi

Suva biomasa algi je dobijena sušenjem taloga izdvojenog centrifugiranjem ukupne količine uzorka sa algama nakon završetka procesa (30 dana), na 105 °C do konstantne mase (Takagi i sar., 2006). Sadržaj ulja algi određivan je gravimetrijski, nakon ekstrakcije iz suve biomase algi i razdvajanja ekstrakcionog sredstva uparavanjem na vakuum uparivaču. Ekstrakcija ulja je izvođena primenom Bligh-Dayer-ove metode. Za ekstrakciju je primenjivan sistem dva organska rastvarača (nepolarni i polarni), u ovom slučaju hloroform i metanol (2:1 v/v), a ekstrakcija je rađena na 25° C. Alge i smeša rastvarača su mešane u epruvetama (1:5) na vorteksu 30 s, a potom centrifugirane na 2000 min<sup>-1</sup>.

Centrifugiranjem, pored taloga, izdvajaju se dva sloja: hloroformski i metanolni. Hloroformski sloj je uparen do suva, nakon čega je merena masa ulja (Iverson i sar., 2001; Kumari i sar., 2012). Kinetika produkcije ulja nije praćena zbog nemogućnosti dobijanja značajne količine biomase u laboratorijskim uslovima.



## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Biosinteza mlečne kiseline bakterijom *Enterococcus faecalis*

#### MK3-10A

U ovom delu rada prikazani su rezultati dobijanja mlečne kiseline gajenjem bakterije *Enterococcus faecalis* MK3-10A na podlogama sa različitim izvorima ugljenika, i to: smeša glukoze i „čistog“ ili otpadnog glicerola, dobijenog u proizvodnji biodizela od suncokretovog i repičinog ulja (u ovom delu označeni kao glicerol SU i glicerol RU), kao i na podlogama koje su sadržale samo „čist“ ili otpadni glicerol. Bakterija je gajena u MRS podlozi standardnog sastava (20 g/l glukoze), kao i u MRS podlogama u kojima je deo glukoze (5 g/l) zamenjen čistim i otpadnim glicerolom. Ranija istraživanja su pokazala stimulatívno dejstvo kombinovanih izvora ugljenika na primarni i sekundarni metabolizam bakterija (Fonte i sar., 2013; Ilić, 2010).

Tokom fermentacija koje su izvođene u uslovima bez mućkanja u termostatu na temperaturi 28 °C, praćen je mikrobni rast (optička gustina podloge) i koncentracije glicerola, glukoze i mlečne kiseline. Promene biomase ( $OD_{620}$ ) i koncentracija glukoze, glicerola i mlečne kiseline u toku mlečnokiselinske fermentacije *E. faecalis* MK3-10A u MRS podlozi sa glukozom (20 g/l), i podlogama sa dva izvora ugljenika (glukoza 15 g/l i glicerol 5 g/l) prikazane su na slici 4.1, dok su rezultati matematičke obrade podataka prikazani u tabeli 4.1.

Na slici 4.1a uočava se dobar rast bakterije *E. faecalis* MK3-10A u svim korišćenim podlogama. Maksimalna koncentracija biomase se postiže u podlozi sa glukozom, a nešto manja, gotovo identična u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU. U podlozi sa glukozom i otpadnim glicerolom RU, rast je smanjen u odnosu na ostale podloge. Faza uzdržanog rasta (lag faza) traje 2 h u podlogama sa glukozom i čistim glicerolom, 4 h u podlozi sa glicerolom SU i 6 h u podlozi glicerolom RU, nakon čega nastupa faza eksponencijalnog rasta do 20 h fermentacije, kada kultura ulazi u stacionarnu fazu. Kultura gajena u podlozi sa glukozom i otpadnim glicerolom RU ulazi u stacionarnu fazu nakon 20 h fermentacije.

Porast biomase dovodi do potrošnje glukoze (slika 4.1b) u prvih 20 h. U toku procesa fermentacije na osnovnoj podlozi, gde je glukoza korišćena kao jedini izvor ugljenika, specifična brzina potrošnje glukoze od 12 mg/ml/dan je najveća, pri čemu je utrošeno 61 % od ukupne raspoložive količine.

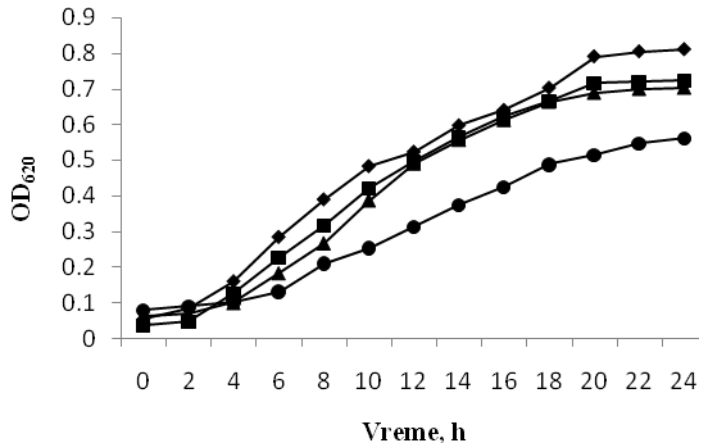
Za razliku od osnovne podloge, na podlogama sa otpadnim glicerolom SU i čistim glicerolom, specifična brzina potrošnje glukoze je manja za 4 %, odnosno 6 %, respektivno, što je posledica korišćenja još jednog izvora ugljenika. Iako je mikrobnii rast niži u podlozi u koju je dodat otpadni glicerol SU nego što je zapaženo u podlozi u koju je dodat čisti glicerol, potrošnja glukoze je veća za 8 %, što ukazuje na stimulatívno dejstvo glicerola na metabolizam glukoze. Najniža potrošnja glukoze (46 %) ostvarena je u podlozi u sa dodatim otpadnim glicerolom RU, u kojoj je ostvaren i najniži rast, što bi se moglo objasniti negativnim uticajem nečistoća prisutnih u otpadnom glicerolu.

Koncentracija glicerola, od početnih 5 g/l, u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU, odnosno glicerolom RU, smanji se za 35 %, 31 % i 26 %, respektivno, odnosno za 24 h utroši se 2,40 mg/ml/dan, 1,44 mg/ml/dan i 1,20 mg/ml/dan (slika 4.1c). Na osnovu dobijenih rezultata potrošnje glukoze i glicerola u toku procesa fermentacije bakterije *E. faecalis* MK3-10A, može se zaključiti da je mikrobnii rast posledica, pre svega korišćenja glukoze kao lakše iskoristivog izvora ugljenika.

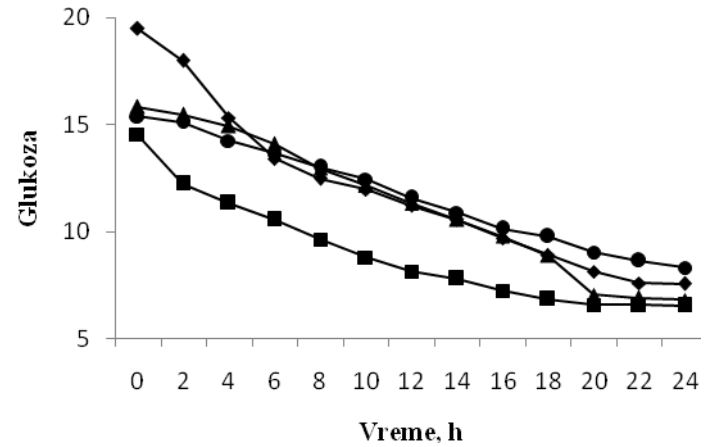
Koncentracija mlečne kiseline, nezavisno od sastava podloge, prati rast i potrošnju izvora ugljenika i povećava se do perioda stagnacije, koji nastupa nakon 20 h fermentacije, kod svih podloga, osim u podlozi sa otpadnim glicerolom RU gde period stagnacije nastupa nakon 22 h (slika 4.1d). Maksimalna koncentracija mlečne kiseline (16,02 mg/ml) postignuta je u podlozi sa glukozom, dok je na podlogama sa glukozom i čistim, odnosno otpadnim glicerolom SU, maksimalna koncentracija niža za 7 %, odnosno 10 %.

U odnosu na podlogu sa čistim glicerolom (13,95 mg/ml), u podlozi u kojoj je dodat otpadni glicerol SU, dobijeno je neznatno manje mlečne kiseline (13,26 mg/ml). Dodatak otpadnog glicerola RU u podlogu sa glukozom smanjuje produkciju mlečne kiseline. Maksimalna koncentracija mlečne kiseline iznosi 11,83 mg/ml, pri čemu je prinos smanjen oko 26 % u odnosu na osnovnu podlogu sa glukozom, odnosno 22% u odnosu na podlogu u kojoj je dodat otpadni glicerol SU.

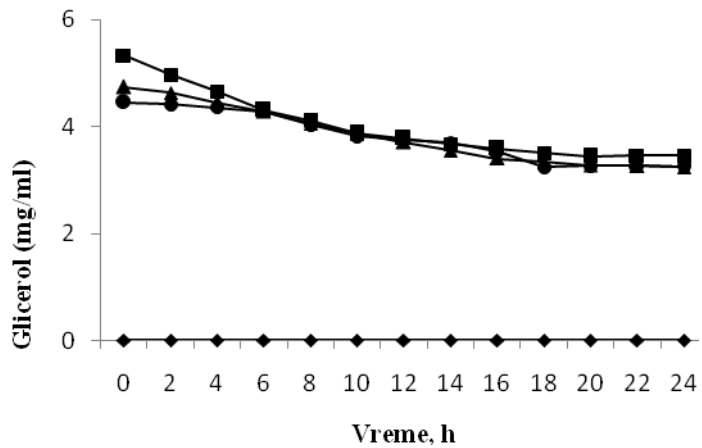
Na osnovu promene koncentracija glukoze, glicerola i mlečne kiseline, zaključuje se da bakterija *E. faecalis* ne koristi svu raspoloživu glukozu i glicerol iz podloge i da se rast zaustavlja inhibitornim dejstvom produkovane mlečne kiseline, nakon 20-22 h. Poznato je da mlečna kiselina u koncentraciji 1-2 % može zaustaviti dalji mikrobnii rast (Cenci i sar., 2002; Gilliland, 2003; Gopal, 2003).



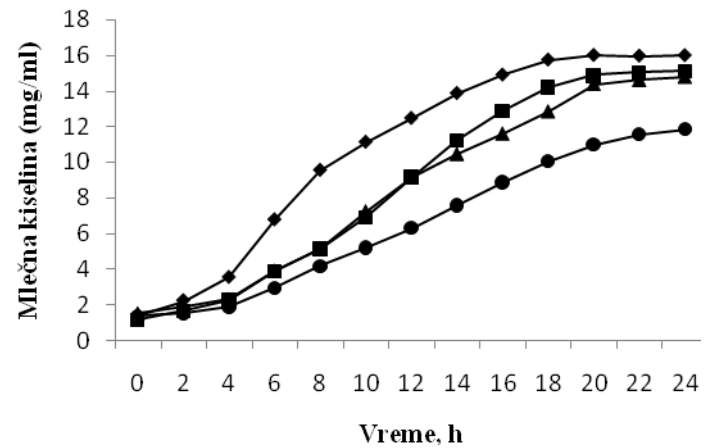
a)



b)



c)



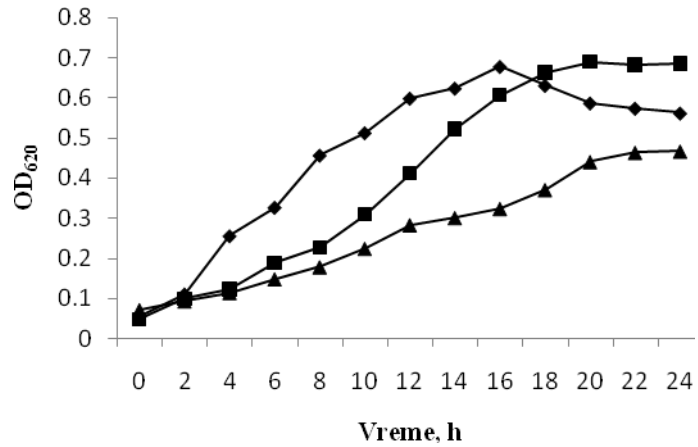
d)

Slika 4.1 Promena a) optičke gustine (biomase) bakterije *E. faecalis* MK3-10A, b) koncentracije glukoze, c) glicerola i d) mlečne kiseline tokom fermentacije u podlozi MRS sa glukozom (◆), MRS podlogama sa glukozom i čistim glicerolom (■), otpadnim glicerolom SU (▲) ili RU (●)

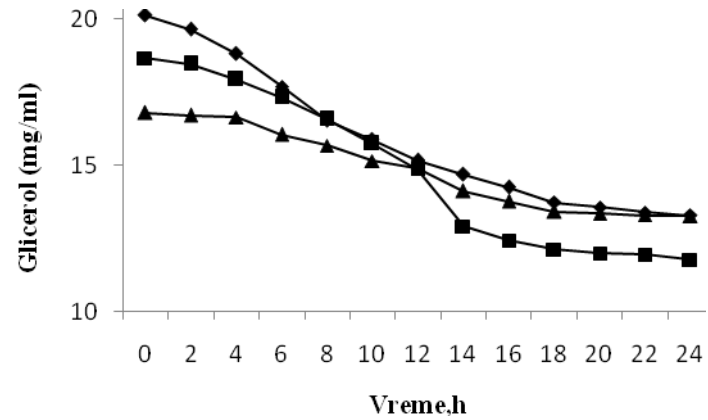
U nastavku ovog poglavlja prikazani su i rezultati proučavanja uticaja čistog i otpadnog glicerola, kao jedinog izvora ugljenika (bez dodate glukoze), na mikrobni rast (OD<sub>620</sub>), promenu koncentracije glicerola i koncentracije mlečne kiseline u toku 24 h mlečnokiselinske fermentacije pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A (slika 4.2.). Sa slike 4.2a, koja prikazuje promenu mikrobnog rasta sa vremenom, uočava se da se najbolji rast postiže u podlozi sa otpadnim glicerolom SU (OD<sub>max</sub>=0,642).

Takođe, na podlozi sa otpadnim glicerolom SU ostvaren je najveći utrošak glicerola, 37 % od raspoložive količine, dok je na podlozi sa čistim glicerolom iznosilo 34 %, što je i očekivano jer je glicerol bio jedini raspoloživi izvor ugljenika (slika 4.2b). Kod podloge sa otpadnim glicerolom RU, zapažen je najniži mikrobni rast (0,396) i potrošnja glicerola (21 %), što se može objasniti nepovoljnim i inhibitornim delovanjem nečistoća sadržanih u ovom tipu otpadnog glicerola (slike 4.2a i 4.2b).

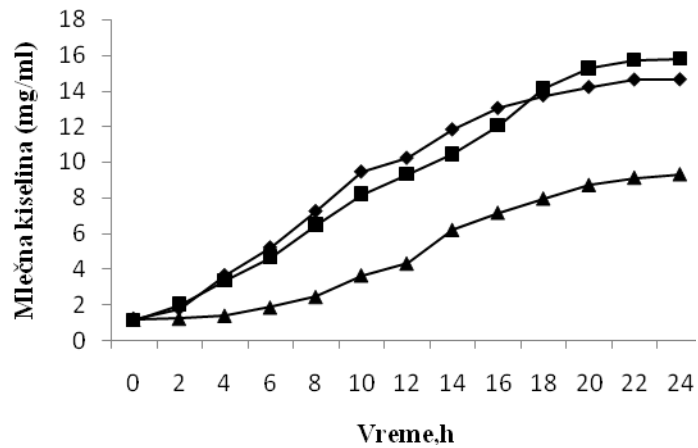
Maksimalna koncentracija produkovane mlečne kiseline (14,64 mg/ml) postignuta je na podlozi sa otpadnim glicerolom SU, što je ujedno i maksimalna vrednost dobijena fermentacijom glicerola kao jedinog izvora ugljenika. Na podlozi sa čistim glicerolom dobijena je nešto niža vrednost maksimalne koncentracije mlečne kiseline (13,44 mg/ml). Kao posledica slabog rasta, odnosno iskorišćenja izvora ugljenika, *E. faecalis* produkuje najmanje mlečne kiseline (8,16 mg/ml) gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom RU (slika 4.2c).



a)



b)



c)

Slika 4.2 Promena a) optičke gustine (biomase) bakterije *E. faecalis* MK3-10A, b) koncentracije glicerola i c) mlečne kiseline tokom fermentacije u podlozi MRS sa čistim glicerolom (◆) ili otpadnim glicerolom SU (■) i RU (▲)

Tabela 4.1 Efekat čistog i otpadnog glicerola na mikrobnii rast ( $\Delta OD_{620}$  od početne vrednosti 0,050), promenu koncentracije ( $\Delta_{gluk}$ ,  $\Delta_{glic}$ ) i utrošak (%) izvora ugljenika kao i na ostvarenu maksimalnu koncentraciju ( $C_{max}^{MK}$ ) i produkciju mlečne kiseline ( $Y_{P/S}^{MK}$ ) u toku fermentacije sa sojem *Enterococcus faecalis* MK3-10A

Izvor ugljenika (g/l)				Karakteristike bioprocasa						
Glukoza	Glicerol			$(\Delta OD_{620})$	$\Delta_{gluk}$		$\Delta_{glic}$		$C_{max}^{MK}$	$Y_{P/S}^{MK}$
	Čist	Otpadni, SU <sup>a</sup>	Otpadni, RU <sup>b</sup>	-	(mg/ml/d)	(%)	(mg/ml/d)	(%)	mg/ml	(mg/ml/d)
20	-	-	-	0,755	12,00	61	-	-	16,01	14,60
15	5	-	-	0,686	8,16	55	2,40	35	15,11	13,95
15	-	5	-	0,640	8,88	57	1,44	31	14,78	13,26
15	-	-	5	0,480	6,96	46	1,20	26	11,83	10,45
-	15	-	-	0,622	-	-	6,48	34	14,65	13,44
-	-	15	-	0,642	-	-	6,96	37	15,78	14,64
-	-	-	15	0,396	-	-	3,60	21	9,34	8,16

<sup>a</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz suncokretovog ulja.

<sup>b</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz repičinog ulja.

Postignute maksimalne vrednosti prinosa mlečne kiseline i potrošnje glicerola gajenjem *E. faecalis* MK3-10A u podlogama sa glukozom i glicerolom, kao i u podlogama samo sa glicerolom, znatno su niže u odnosu na ostvarene rezultate sa nekim modifikovanim sojevima *E. faecalis* i otpadnom glicerolom iz proizvodnje biodizela (Doi, 2015; Murakami i sar., 2016). Objavljeno je da su maksimalne koncentracije mlečne kiseline dobijene u podlogama u kojima je dodavan otpadni glicerol (30 g/l) iznosile 45 – 55 mg/ml, što je, bez obzira na dvostruko veću koncentraciju glicerola, znatno više nego što je ostvareno sa sojem *E. faecalis* MK3-10A. Murakami i saradnici (2016), objavili su i rezultate istraživanja sa modifikovanim sojem, gde je mikrobnii rast ( $OD_{620}$ ) 44 % veći nego što je ostvaren sa sojem *E. faecalis* MK3-10A. Neki istraživači su objavili da modifikovani sojevi *E.coli*, *K. pneumoniae* i *R. oryzae* gajenjem u podlogama sa glicerolom, mogu proizvoditi mlečnu kiselinu u koncentraciji većoj od 30 mg/ml (Feng i sar., 2014; Hong i sar., 2009; Mazumdar i sar., 2010; Tian i sar., 2012; Vodnar i sar., 2013).

Kako u navedenim uslovima bakterija *E. faecalis* MK3-10A nije proizvela značajnu količinu mlečne kiseline, može se zaključiti da nije pogodna za gajenje u cilju dobijanja mlečne kiseline fermentacijom otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela.

## 4.2 Biosinteza antibiotika bakterijom *Streptomyces hygroscopicus* CH-7

### 4.2.1 Biosinteza antibiotika na osnovnoj podlozi sa sojom uz dodatak čistog i otpadnog glicerola

U cilju proučavanja mogućnosti iskorišćenja otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela, bakterija *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 gajena je na OSP podlozi, koja kao izvor ugljenika sadrži glukozu (15 g/l) i podlogama izmenjenog sastava u kojima je glukozu zamenjena čistim i otpadnim glicerolom. U toku fermentacije, praćen je mikrobni rast (promena suve biomase), potrošnja izvora ugljenika (glukoza i glicerol) i produkcija antibiotika heksaena H-85 i azalomicina B. Fermentacija je praćena 168 h (8 dana), a na svakih 24 h rađeno je uzorkovanje. Na slici 4.3 su prikazane promene praćenih parametara u toku fermentacije, dok su u tabeli 4.2 prikazane ostvarene maksimalne vrednosti suve biomase, potrošnje glicerola i glukoze, kao i maksimalne koncentracije heksaena H-85 i azalomicina B.

Najveća maksimalna koncentracija suve biomase bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 i najviši utrošak izvora ugljenika koji je, najčešće, kod većine mikroorganizama limitirajući supstrat (Baras i sar., 2009), zapaženi su u podlozi sa glukozom. Ovaj efekat je očekivan zbog jednostavnijeg metabolisanja glukoze a ostvarene vrednosti su u saglasnosti sa objavljenim rezultatima (Ilić, 2010). Maksimalna koncentracija suve biomase je zapažena je u podlozi sa glukozom nakon 72 h fermentacije i iznosi 10,18 g/l (tabela 4.2). Najveći utrošak glukoze postiže se od 72-96 h fermentacije (86 % raspoložive količine). Daljim tokom fermentacije, sadržaj glukoze opada, pri čemu je do kraja fermentacije ostvaren utrošak od 98 % ukupne raspoložive količine. U podlozi sa čistim glicerolom maksimalna koncentracija suve biomase je neznatno veća od rasta u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, pri čemu su maksimalne vrednosti (9,04 g/l odnosno 8,88 g/l) postignute u 48 h fermentacije, a niže su za 12 % odnosno 13 % u odnosu na podlogu sa glukozom (slika 4.3a), dok je potrošnja glicerola skoro dvostruko manja (47 i 42 %) u poređenju sa potrošnjom glukoze (slika 4.3b).

Najmanji rast, uz ostvarenu maksimalnu koncentraciju suve biomase od 6,52 g/l nakon 96 h fermentacije, zapažen je u podlozi sa otpadnim glicerolom RU, a potrošeno je 36 % raspoloživog glicerola, što je ujedno i najniža potrošnja.

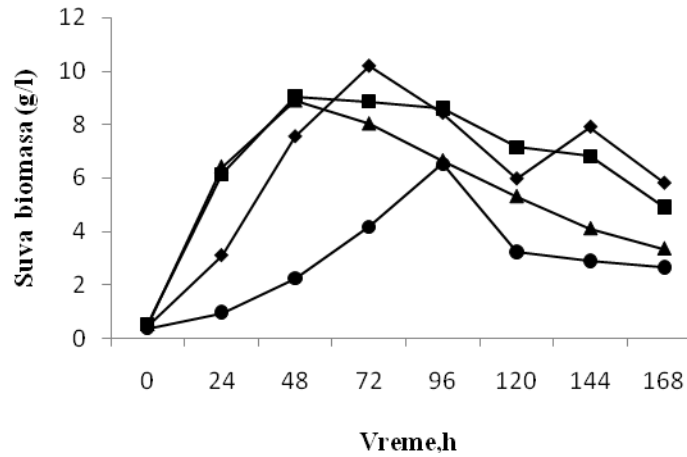


Maksimalne koncentracije antibiotika u toku procesa fermentacije pomoću bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 zavise od izvora ugljenika. U svim slučajevima, nakon dostizanja maksimalne vrednosti, koncentracija antibiotika opada sa vremenom. Povećanje koncentracije antibiotika i vreme dostizanja maksimuma nije povezano sa potrošnjom supstrata, što je karakteristično za biosintezu antibiotika. To ukazuje na nezavisnost produkcije antibiotika, odnosno sekundarnih metabolita, od iskorišćenja supstrata i mikrobnog rasta.

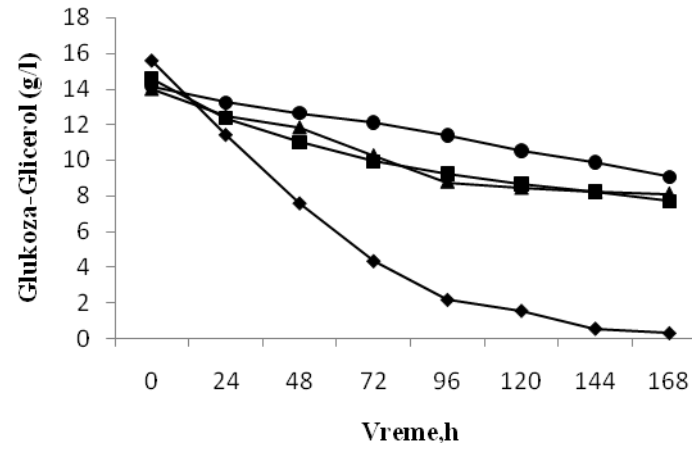
U eksperimentu na osnovnoj podlozi sa otpadnim glicerolom SU, maksimalna koncentracija heksaena H-85 se dostiže posle 72 h fermentacije i iznosi 162 µg/ml, što je za 10 % više od maksimalno postignute koncentracije u podlozi sa glukozom (146 µg/ml) koja se postiže posle 96 h fermentacije (slika 4.3c). U podlozi sa čistim glicerolom, postignuta je za 18 % manja maksimalna koncentracija heksaena H-85 (121 µg/ml) u odnosu na podlogu sa glukozom, dok je najniža koncentracija (94 µg/ml) postignuta u podlozi sa otpadnim glicerolom RU.

Za razliku od heksaena H-85, maksimalna koncentracija azalomicina B (38,7 µg/ml) je ostvarena nakon 72 h fermentacije u podlozi sa glukozom, a manje koncentracije postignute su nakon 96 h fermentacije u podlogama sa čistim glicerolom (33,1 µg/ml) i otpadnim glicerolom RU (24,4 µg/ml) (slika 4.3d). U podlozi sa otpadnim glicerolom SU, bakterija *S. hygroscopicus* CH-7 je produkovala najmanju količinu azalomicina B, pri čemu je maksimalna koncentracija od 11,0 µg/ml postignuta nakon 48 h.

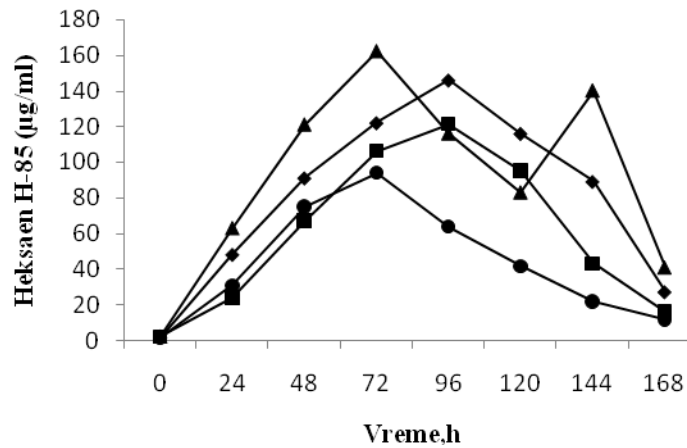
Ostvarene maksimalne koncentracije heksaena H-85 su oko 20 % niže od ostvarenih koncentracija u prethodno objavljenim istraživanjima sa raznim izvorima ugljenika (Ilić, 2010), dok su maksimalne koncentracije azalomicina B skoro dvostruko niže.



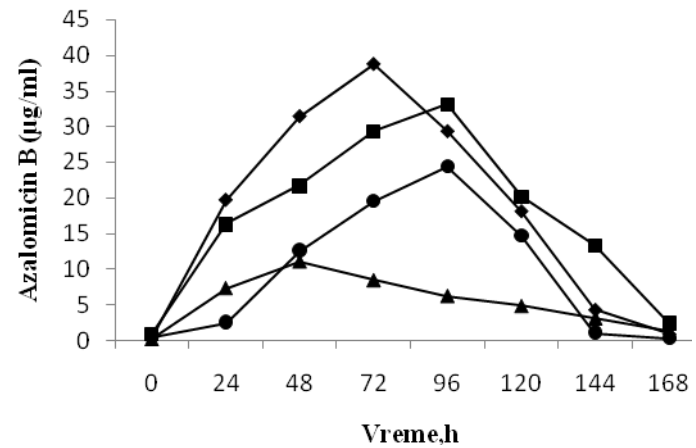
a)



b)



c)



d)

Slika 4.3 Promena koncentracije a) suve biomase bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, b) izvora ugljenika, c) antibiotika heksaena H-85 i d) azalomicina B tokom fermentacije osnovnoj podlozi sa glukozom (♦), čistim glicerolom (■), i otpadnim glicerolom SU (▲) i RU (●)

Tabela 4.2 Maksimalne vrednosti koncentracije suve biomase (SBM), potrošnje glicerola ( $\Delta_{\text{glic}}$ ) i maksimalne koncentracije heksaena H-85 i azalomicina B ( $C_{\text{max}}$ ) kao i specifična brzina njihovog nastajanja ( $q_p$ ) gajenjem bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa glukozom i glicerolom

Izvor ugljenika (g/l)				Karakteristike bioprocesa									
Glukoza	Glicerol			SBM	$\Delta_{\text{gluk}}$		$\Delta_{\text{glic}}$		Heksaen H-85		Azalomicin B		
	Čist	Otpadni, SU <sup>a</sup>	Otpadni, RU <sup>b</sup>	$X_{\text{max}}$ (g/l)	(g/l)	(%)	(g/l)	(%)	$C_{\text{max}}$ (μg/ml)	$q_p$ (mg/g/d)	$C_{\text{max}}$ (μg/ml)	$q_p$ (mg/g/d)	
15	-	-	-	10,18	15,24	98	-	-	146	2	38,7	0,5	
-	15	-	-	9,04	-	-	6,85	47	121	1,8	33,1	0,5	
-	-	15	-	8,88	-	-	5,87	42	162	2,6	11,0	0,2	
-	-	-	15	6,52	-	-	5,10	36	94	2	24,4	0,5	

<sup>a</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz suncokretovog ulja.

<sup>b</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz repičinog ulja.

Bakterija *S. hygroscopicus* CH-7 proizvodi veće količine azalomicina B u podlogama u kojima su korišćene čiste supstance (glukoza i glicerol) kao izvor ugljenika, dok u podlogama sa otpadnim glicerolom iz proizvodnje biodizela, posebno SU, sinteza je supresirana. Suprotno tome, otpadni glicerol SU, odnosno neki sastojci iz otpadnog glicerola, podstiču sekundarni metabolički put bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 i usmeravaju ga ka produkciji veće količine heksaena H-85. Otpadni glicerol RU se pokazao kao najmanje pogodan supstrat za gajenje bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 u cilju produkcije antibiotika.

#### 4.2.2 Biosinteza antibiotika na podlozi sa glicerolom uz dodatak derivata izatina kao izvora azota

U cilju proučavanja mogućnosti povećanja prinosa heksaena H-85 i azalomicina B, kao i veće potrošnje otpadnog glicerola, detaljnije je proučavan uticaj derivata izatina, kao izvora azota, na bakteriju *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, koja je gajena u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU i RU. Sojino brašno, kao izvor azota, iz osnovne podloge za gajenje *S. hygroscopicus* CH-7, zamenjeno je aminokiselinom triptofanom (15 g/l), a deo sojinog brašna (5 g/l) derivatima izatina i triptofanom (10 g/l). Kao izvor ugljenika, umesto glukoze, korišćeni su čist i otpadni glicerol SU i RU, u istoj početnoj koncentraciji (15 g/l).

Aminokiseline su poznate kao dobar izvor azota za gajenje mikroorganizama (Mahesh i Meenakshi, 2013; Rattleff, 2013), kao i sam triptofan, koji je već korišćen za produkciju antibiotika pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 (Ilić i sar., 2010b). Triptofan je sličan izatinu po indolovom jezgru koje je sastavni deo njihove strukture, pa je to i razlog zbog kog su derivati izatina uzeti za korišćenje kao izvori azota u bioprocima za dobijanje antibiotika. Pored triptofana, korišćeni su još i 5-hloroizatin-3-hidrazon, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon, izatin-3-tozilhidrazon, izatin-3-hidrazon, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon.

U tabeli 4.3, prikazan je efekat triptofana i derivata izatina na maksimalnu koncentraciju suve biomase, ukupan utrošak glicerola i produkciju antibiotika, dok su na slikama 4.4-4.7 prikazane promene koncentracije suve biomase, glicerola i antibiotika heksaena H-85 i azalomicina B.

#### 4.2.2.1 Uticaj derivata izatina na rast bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa glicerolom

U ovom delu rada prikazani su rezultati uticaja triptofana i derivata izatina, kao izvora azota, na mikrobnii rast, potrošnju glicerola i kinetiku produkcije heksaena H-85 i azalomicina B pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7.

Na slici 4.4a, prikazan je uticaj triptofana, 5-hloroizatin-3-hidrazona, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazona, izatin-3-tozilhidrazona, izatin-3-hidrazona, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazona i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazona na promenu koncentracije suve biomase u toku procesa fermentacije na podlozi sa čistim glicerolom, kao izvorom ugljenika. Dodatak triptofana i derivata izatina u osnovnu podlogu različito utiče na rast produkcionog soja.

Zavisno od sastava podloge, odnosno izvora azota, koncentracija biomase raste u prvih 48 do 72 h nakon čega počinje da pada. Maksimalne koncentracije suve biomase su izmerene na podlogama sa izatin-3-hidrazonom ( $X_{\max}=9,5$  g/l) i triptofanom ( $X_{\max}=9,3$  g/l), nakon 48 h od početka fermentacije. Dobijene vrednosti su manje za 2 % odnosno 5% u odnosu na osnovnu podlogu (glukoza, kao izvor ugljenika i sojino brašno, kao izvor azota), ali su veće za 11 odnosno 9% od vrednosti dobijenih na podlozi sa čistim glicerolom i sojinim brašnom (tabela 4.3). Ovo ukazuje na stimulatívno dejstvo izatin-3-hidrazona i triptofana, kao izvora azota, na rast u podlozi sa čistim glicerolom.

Na podlozi sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom dobija se nešto niža vrednost maksimalne koncentracije suve biomase ( $X_{\max}=8,8$  g/l) u odnosu na osnovnu podlogu, dok su na podlogama sa 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom postignute niže i skoro identične vrednosti (8,0 g/l, 8,1 g/l i 8,2 g/l). Najniža vrednost biomase (6,8 g/l), postignuta je u podlozi sa 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (tabela 4.3).

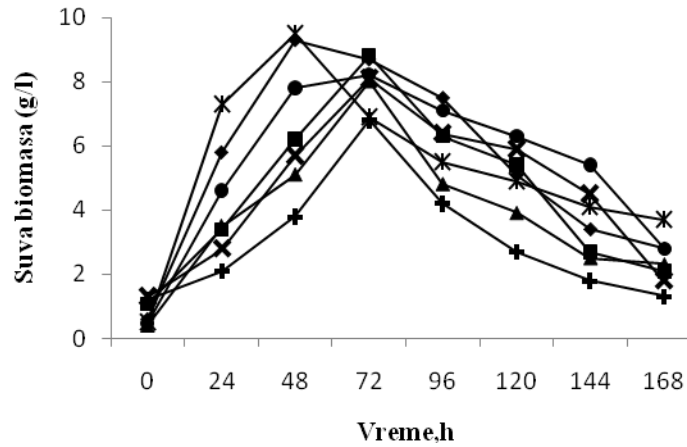
Promena koncentracije suve biomase u toku procesa fermentacije na podlozi sa otpadnim glicerolom SU i RU, triptofanom i derivatima izatina (5-hloroizatin-3-hidrazon, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon, izatin-3-tozilhidrazon, izatin-3-hidrazon, izatin-3-(4`-hidroksi) benzoilhidrazon i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon) prikazana je na slikama 4.4b i 4.4c. Za razliku od rasta u podlozi sa čistim glicerolom, u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, mikrobn rast je sporiji, a maksimalna koncentracija suve biomase se postiže nakon 72 do 96 h od početka fermentacije. U podlozi sa triptofanom maksimalna vrednost suve biomase postiže se nakon 48 h, kao u podlozi sa čistim glicerolom (slika 4.4b). U svim podlogama je zabeležen niži rast u odnosu na rast u podlogama sa čistim glicerolom, osim u podlozi sa 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (2,5 % viši) i izatin-3-hidrazonom.

Maksimalna koncentracija suve biomase postignuta je na podlozi sa izatin-3-hidrazonom (za 3% veća) i iznosi 9,7 g/l, što je ujedno i najviša vrednost za podloge sa glicerolom SU. Približno 7 % niži rast u odnosu na vrednosti postignute u podlogama sa čistim glicerolom, zapažen je u podlogama sa triptofanom (8,7 g/l), 5-hloroizatin-3-hidrazonom (8,4 g/l) i izatin-3-(4`-hidroksi)-benzoilhidrazonom (7,6 g/l), dok je u podlogama sa 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (5,9 g/l) i 5-hloroizatin-3-(4`hidroksi) benzoilhidrazonom (5,4 g/l) ostvarena maksimalna koncentracija suve biomase 27 % odnosno 20 % niža.

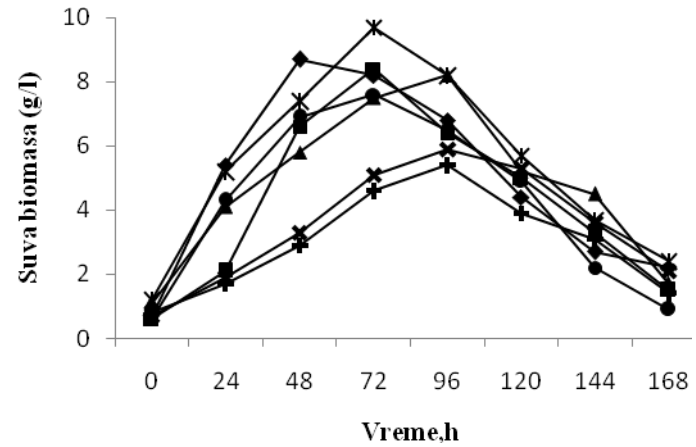
U podlogama sa otpadnim glicerolom RU, maksimalna koncentracija biomase postiže se od 72 h do 96. h, a sve vrednosti su znatno niže od postignutih u podlozi sa čistim glicerolom (slika 4.4c). Mikrobn rast je znatno niži i u odnosu na podloge sa glicerolom SU, osim u podlogama sa izatin-3-tozilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi) benzoilhidrazonom (za 2 % odnosno 3% niža).

Maksimalne koncentracije suve biomase postignute su u podlogama sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom (7,1 g/l) nakon 72 h i triptofanom (6,9 g/l) nakon 96 h, što nije bio slučaj u podlogama sa čistim glicerolom i glicerolom SU u kojima je najviša maksimalna koncentracija suve biomase ostvarena u podlozi sa izatin-3-hidrazonom (tabela 4.3).

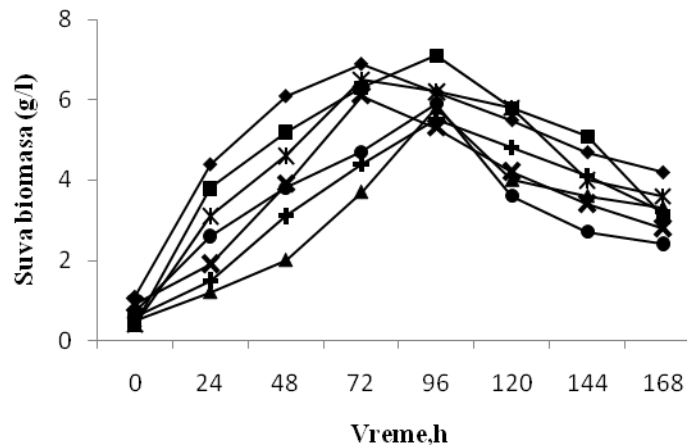
Uporedo sa svim ispitanim podlogama, najslabiji rast (5,5 g/l), kao i u prethodnim fermentacijama, ostvaren je u podlozi sa 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (5,8 g/l).



a)



b)



c)

Slika 4.4 Uticaj triptofana (♦), 5-hloroizatin-3-hidrazona (■), 5-hloroizatin-3-tozilhidrazona (▲), izatin-3-tozilhidrazona (×), izatin-3-hidrazona (\*), izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazona (●) i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi) benzoilhidrazona (+) na promenu koncentracije suve biomase u toku fermentacije na podlozi sa a) čistim i b) otpadnim glicerolom SU i c) RU

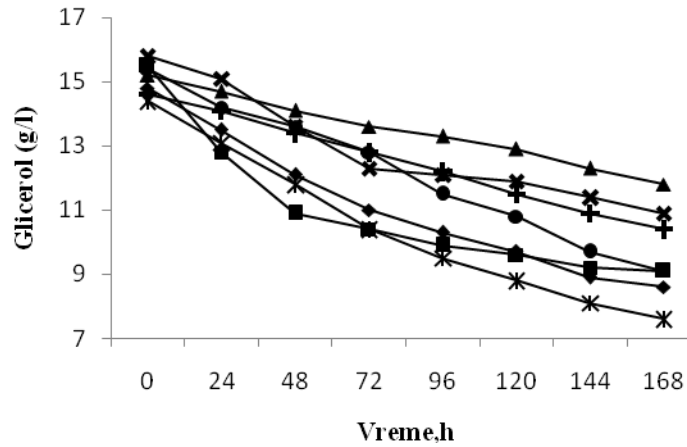
Promena koncentracije glicerola, tokom fermentacija pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU i RU, kao izvorom ugljenika, i triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3 tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi) benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom, kao izvorom azota, prikazane su na slici 4.5. Potrošnja glicerola prati mikrobnii rast, pa je zapaženo da je, bez obzira na različite postignute vrednosti, zavisno od izvora azota, ostvaren najviši utrošak u podlogama sa čistim glicerolom (22 – 47 %), niži u podlogama sa otpadnim glicerolom SU (18 – 36 %), a najniži u podlogama sa otpadnim glicerolom RU (16 – 29 %) (tabela 4.3).

U dostupnoj literaturi nema podataka o potrošnji glicerola kao ni objavljenih rezultata istraživanja u kojima je izvođena fermentacija glicerola pomoću bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 uz dodatak derivata izatina odnosno Schiff-ovih baza, kao izvora azota.

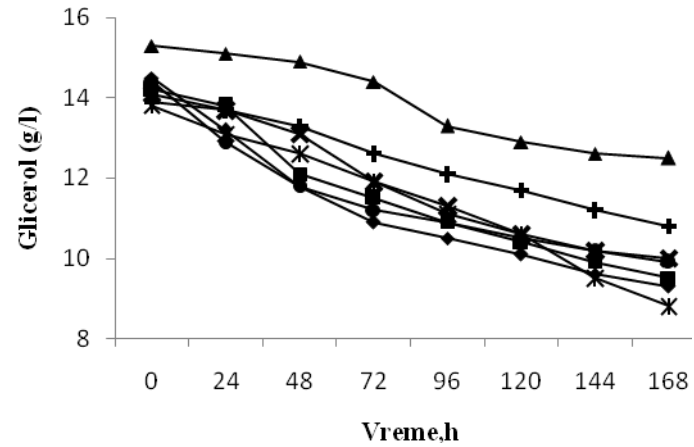
U podlozi sa čistim glicerolom i izatin-3-hidrazonom utrošeno je 6,8 mg/ml glicerola odnosno 47 % od ukupne raspoložive količine, identično kao u osnovnoj podlozi sa sojom (tabela 4.2), što predstavlja najviši utrošak glicerola, uporedo sa svim fermentacijama sa otpadnim glicerolom i derivatima izatina. Identičan utrošak od 41 % ostvaren je fermentacijom čistog glicerola u podlogama sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom (6,4 mg/ml) i izatin-3-(4`-hidroksi) benzoilhidrazonom (6,3 mg/ml) dok je neznatno viši utrošak od 42 % (6,2 mg/ml) ostvaren u podlozi sa triptofanom. Najmanje glicerola utrošeno je u podlogama sa 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom, 4,2 mg/ml što je 29 % od ukupne raspoložive količine, i 5-hloroizatin-3 tozilhidrazonom, 3,4 mg/ml odnosno 22 %.

Fermentacijom glicerola SU, ostvarena je niža potrošnja glicerola, pri čemu je najveća specifična brzina potrošnje od 36 % postignuta u podlogama sa triptofanom (5,22 mg/ml) i izatin-3-hidrazonom (4,96 mg/ml). Kao i u procesima fermentacije čistog glicerola, najniži utrošak je ostvaren u podlogama sa 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (22 %) i 5-hloroizatin-3 tozilhidrazonom (18 %).

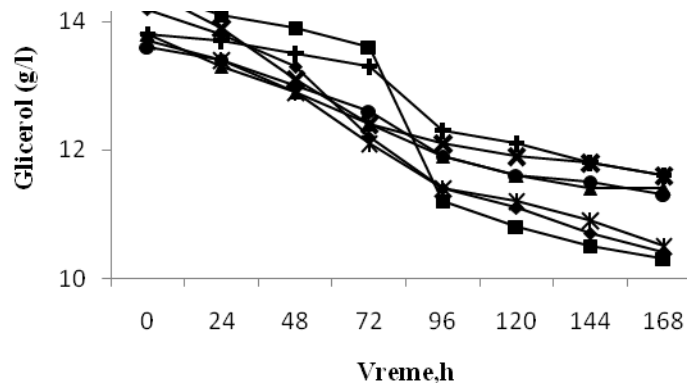




a)



b)



c)

Slika 4.5 Promena koncentracije glicerola tokom fermentacije a) čistog i b) otpadnog glicerola SU i c) RU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom (◆), 5-hloroizatin-3-hidrazonom (■), 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (▲), izatin-3-tozilhidrazonom (\*), izatin-3-hidrazonom (\*), izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (●) i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (+)

Sve promene koncentracije glicerola, fermentacijom glicerola RU, bile su ispod 30 % što je niže u odnosu na potrošnju ostvarenu u osnovnoj podlozi sa sojom (36 %). Najveća potrošnja glicerola ostvarena je u podlogama sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom (29 %) i triptofanom (27 %), dok je najniža potrošnja zapažena u podlogama sa 5-hloroizatin-3-(4` hidroksi) benzoilhidrazonom (16 %) i podlogama sa 5-hloroizatin-3 tozilhidrazonom i izatin-3-(4`-hidroksi) benzoilhidrazonom (17 %). Ovo su ujedno i najniže vrednosti potrošnje glicerola postignute u svim fermentacijama sa čistim i otpadnim glicerolom i derivatima izatina.

U većini podloga, koncentracija glicerola nastavi da opada i nakon ulaska u stacionarnu, odnosno fazu odumiranja. Različito od promene koncentracije glicerola u većini podloga, u podlogama sa čistim glicerolom i 5-hloroizatin-3-hidrazonom i izatin-3-tozilhidrazonom, otpadnim glicerolom SU i 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom i otpadnim glicerolom RU i 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom zapaženo je da najveća koncentracija glicerola opadne u prvih 72 - 96 h a nakon čega neznatno nastavi da opada, što je usaglašeno sa mikrobnim rastom.

Najviša promena koncentracije od 2,4 mg/ml, u period rasta, zapažena je između 72 i 96 h u podlozi sa otpadnim glicerolom RU i 5-hloroizatin-3-hidrazonom, kada je ujedno i postignuta najviša koncentracija suve biomase.

#### 4.2.2.3 Uticaj derivata izatina na sintezu antibiotika heksaena H-85 i azalomicina B

U prethodnim istraživanjima, pokazano je da Schiff-ove baze, odnosno derivati izatina, imaju stimulativan efekat na produkciju antibiotika pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 (Ilić, 2010; Ilić i sar., 2010a). Ostvareni rezultati fermentacija pokazuju da derivati izatina imaju različit uticaj na produkciju antibiotika pomoću soja *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 (tabela 4.3).

Zavisno od izvora azota (derivata izatina) i glicerola koji je korišćen kao izvor ugljenika, ostvarene maksimalne koncentracije heksaena H-85 kreću se u opsegu od 97 do 196 µg/ml, a azalomicina B od 27 do 75 µg/ml. Najveća maksimalna koncentracija (196 µg/ml) i specifična brzina stvaranja heksaena H-85 od 2,8 µg/g/d, postignuta je u podlozi sa glicerolom SU i izatin-3-hidrazonom, dok je u podlozi sa glicerolom RU i izatin-3-hidrazonom postignuta najveća maksimalna koncentracija azalomicina B (75 µg/ml) i specifična brzina stvaranja od 1,7 µg/g/d azalomicina B. Promena koncentracije heksaena H-85 u toku procesa fermentacije na podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU i RU, prikazana je na slici 4.6 a promena koncentracije azalomicina B na slici 4.7.

U svim podlogama sa čistim glicerolom, koncentracija heksaena H-85 raste u prvih 72 do 96 h, kada dostiže maksimum, osim u podlozi sa 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom, gde je porast koncentracije zapažen do 120 h (slika 4.6a). Maksimalne koncentracije heksaena H-86 postignute su nakon 96 h u podlogama sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom (194 µg/ml) i izatin-3-hidrazonom (182 µg/ml), što je za 23 % odnosno 7 % više u odnosu na podlogu sa triptofanom (149 µg/ml).

Dodatak 5-hloroizatin-3-tozilhidrazona i izatin-3-tozilhidrazona, takođe, stimuliše produkciju heksaena H-85 i dobijaju se veće koncentracije antibiotika (166 µg/ml odnosno 161 µg/ml) u odnosu na podlogu sa triptofanom. Najniže vrednosti postignute su u podlogama sa izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (138 µg/ml) nakon 96 h i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (145 µg/ml) u 120 h fermentacije. U svim podlogama sa čistim glicerolom, triptofanom i derivatima izatina, postignute su više koncentracije ovog antibiotika u odnosu na maksimalnu koncentraciju od 121 µg/ml, koja je postignuta u osnovnoj podlozi sa sojom i čistim glicerolom (tabela 4.2).

Ostvarene vrednosti koncentracija heksaena H-85 u podlogama sa čistim glicerolom, prosečno su za 4% veće od svih vrednosti postignutih u podlogama sa glicerolom SU, odnosno za 20 % više od svih vrednosti postignutih u podlogama sa glicerolom RU. S druge strane, postignuta maksimalna vrednost heksaena H-85 u podlozi sa glicerolom SU i izatin-3-hidrazonom (196 µg/ml) je bila viša nego što je postignuto u podlozi sa čistim glicerolom.

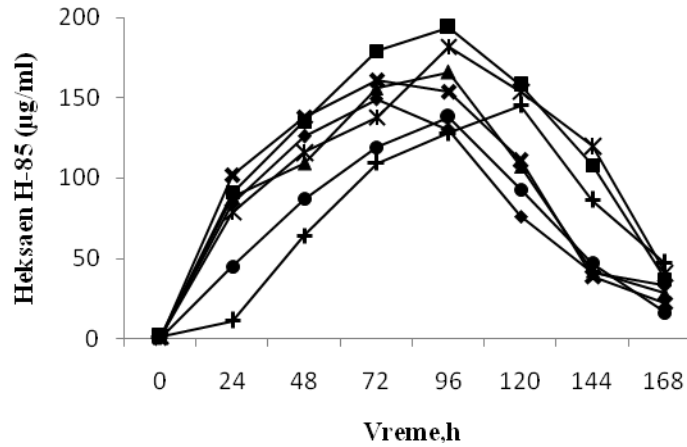
U podlogama sa glicerolom SU maksimalna koncentracija heksaena H-85 postiže se u periodu 72 - 120 h (slika 4.6b). Dodatak 5-hloroizatin-3-hidrazona smanjuje produkciju heksaena H-85 u odnosu na podlogu sa izatin-3-hidrazonom. Maksimalna koncentracija heksaena H-85 na podlozi sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom iznosi 186 µg/ml, pri čemu je specifična brzina stvaranja smanjena za 5%.

Kada su u osnovnu podlogu dodati 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon i triptofan, proizvedeno je, nakon 96 i 72 h, 18 i 23 % manje antibiotika (161 µg/ml odnosno 151 µg/ml), u odnosu na najvišu vrednost u podlozi sa izatin-3-hidrazonom (196 µg/ml). Najniže koncentracije antibiotika postignute su u podlogama sa izatin-3-tozilhidrazonom (134 µg/ml) i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (128 µg/ml) nakon 120 h fermentacije.

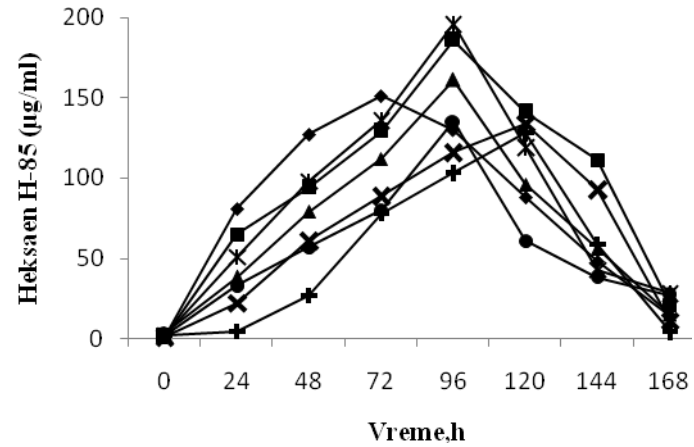
Maksimalne koncentracije heksaena H-85 u podlogama sa otpadnim glicerolom RU su u proseku za 18 % niže nego u podlogama sa otpadnim glicerolom SU. Koncentracija antibiotika se neznatno uvećava u prvih 48 h, pa se i maksimalne koncentracije dostižu kasnije, odnosno u periodu od 96 do 120 h (slika 4.6c). Najviše koncentracije heksaena H-85 postignute su nakon 96 h u podlogama sa izatin-3-hidrazonom (153 µg/ml) i triptofanom (141 µg/ml).

Niže vrednosti maksimalnih koncentracija dobijene su u podlogama sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom (133 µg/ml) nakon 96 h, odnosno nakon 120 h u podlogama sa 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (137 µg/ml), 5-hloroizatin-3-hidrazonom (133 µg/ml), izatin-3-tozilhidrazonom (122 µg/ml) i izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (118 µg/ml). Najniža koncentracija od 97 µg/ml, postignuta u podlozi sa 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom nakon 120 h, ujedno je i najniža koncentracija heksaena H-85 postignuta u svim podlogama sa derivatima izatina i glicerolom.

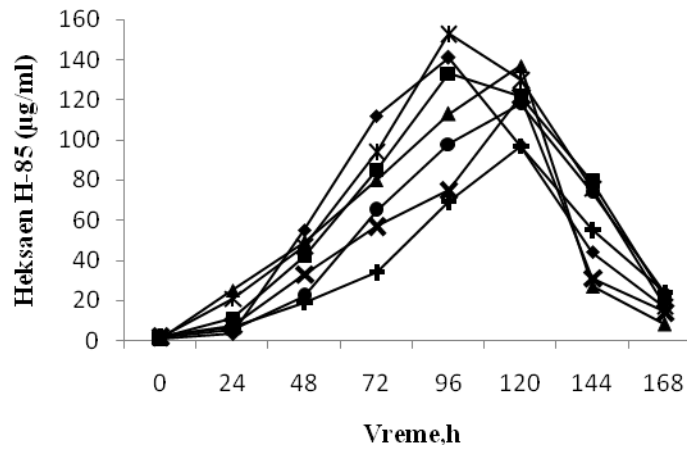
U svakom slučaju, sve postignute vrednosti koncentracija su više od maksimalne koncentracije heksaena H-85 (94 µg/ml) postignute u osnovnoj podlozi sa sojom i otpadnim glicerolom RU (tabela 4.2).



a)



b)



c)

Slika 4.6 Promena koncentracije heksaena H-85 tokom fermentacije a) čistog i b) otpadnog glicerola SU i c) RU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom (◆), 5-hloroizatin-3-hidrazonom (■), 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (▲), izatin-3-tozilhidrazonom (×), izatin-3-hidrazonom (\*), izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (●) i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (+)

Za razliku od heksaena H-85, najviše azalomicina B produkovano je u podlogama sa otpadnim glicerolom RU gde su ostvarene vrednosti prosečno više za 6 % od vrednosti dobijenih u čistom glicerolu, a 28 % više od vrednosti dobijenih u otpadnom glicerolu SU (tabela 4.3). Koncentracija azalomicina B, zavisno od izvora azota, raste do dostizanja maksimuma u period od 96 do 120 h fermentacije, nakon čega opada (slika 4.7). Jedino u podlozi sa čistim glicerolom i 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, maksimalna koncentracija od 47 µg/ml postiže se u 72 h (slika 4.7a).

Uz čist glicerol, najviša koncentracija azalomicina B od 64 µg/ml, postignuta je u podlozi sa izatin-3-tozilhidrazonom u 96. h, pri čemu je ostvarena specifična brzina stvaranja proizvoda od 1,1 mg/g/d u odnosu na suhu biomasu. U podlogama sa izatin-3-hidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom, nakon 120 h, koncentracija azalomicina B je dostigla vrednost od 59 odnosno 42 µg/ml, dok su nakon 96 h postignute maksimalne vrednosti u podlogama sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom (53 µg/ml) i izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (52 µg/ml). U podlozi sa triptofanom, najviša koncentracija azalomicina B od 38 µg/ml, postiže se takođe, nakon 96 h i predstavlja najnižu ostvarenu vrednost postignutu u podlogama sa čistim glicerolom. Sve dobijene vrednosti, više su od maksimalno ostvarene koncentracije od 33 µg/ml i specifične brzine stvaranja proizvoda od 0,5 mg/g/d u osnovnoj podlozi sa sojom i čistim glicerolom (tabela 4.2).

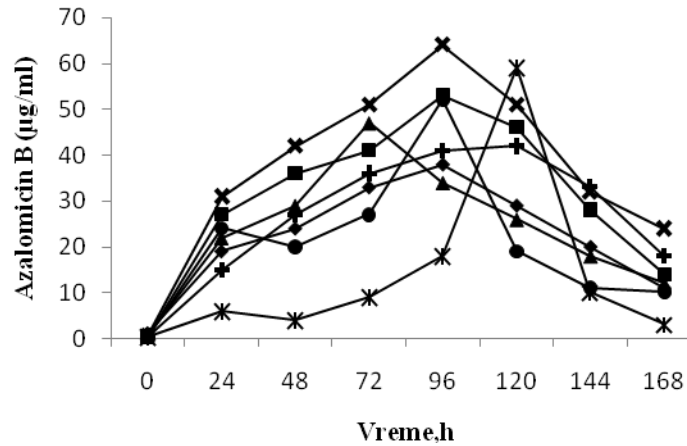
U podlogama sa otpadnim glicerolom SU produkovano je najmanje azalomicina B, pri čemu su sve vrednosti, više od postignute vrednosti (11 µg/ml) u osnovnoj podlozi sa sojom i otpadnim glicerolom SU (tabela 4.3). Koncentracija azalomicina B, zavisno od izvora azota, dostiže maksimum u periodu od 96 do 120 h (slika 4.7b). Maksimalna koncentracija antibiotika u podlogama sa triptofanom (32 µg/ml), 5-hloroizatin-3-hidrazonom (27 µg/ml), 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (42 µg/ml) i izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom (35 µg/ml) postiže se do 96 h nakon čega opada. U podlogama sa izatin-3-hidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom, maksimalne koncentracije od 49, 46 i 38 µg/ml postignute su nakon 120 h, pri čemu je zapaženo da pre dostizanja maksimuma, nakon porasta u prvih 24 do 48 h dolazi do blagog pada koncentracije nakon čega opet raste do maksimuma.

Na osnovu prethodno pomenutog, može se primetiti da je najviša koncentracija antibiotika od 49 µg/ml postignuta u podlozi sa izatin-3-hidrazonom. Najniža koncentracija (27 µg/ml) postignuta je u podlozi sa 5-hloroizatin-3-hidrazonom, pri čemu je to ujedno i najniža koncentracija azalomicina B postignuta u svim fermentacijama glicerola sa triptofanom i derivatima izatina.

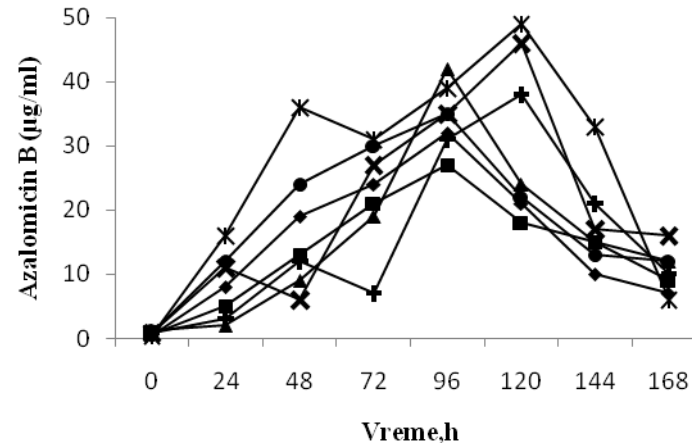
Bez obzira na najslabiji rast, bakterija *S. hygroscopicus* CH-7 produkovala je najviše azalomicina B u podlogama sa otpadnim glicerolom RU. Korišćenjem triptofana i derivata izatina kao izvor azota, postignute su maksimalne koncentracije azalomicina B od 33 do 75 µg/ml (tabela 4.3), pri čemu su sve vrednosti više od 24 µg/ml, što je postignuto u osnovnoj podlozi sa sojom i otpadnim glicerolom RU (tabela 4.2). Ovim rezultatima se još jednom potvrđuje stimulatívno dejstvo derivata izatina na produkciju antibiotika.

Na slici 4.7c, na kojoj su prikazane promene koncentracija azalomicina B u toku fermentacije otpadnog glicerola RU, može se uočiti da koncentracija antibiotika raste do perioda od 96 do 120 h, nakon čega opada. Slično kao prilikom fermentacije otpadnog glicerola SU, u podlogama sa izatin-3-hidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom, koncentracija antibiotika raste do 24 odnosno 48 h, nakon čega do naredne tačke padne za 35 odnosno 38 %, nakon čega ponovo nastavi da raste do dostizanja maksimalnih vrednosti.

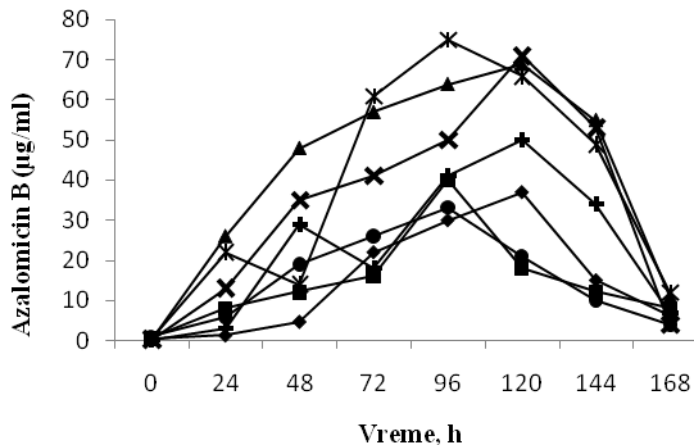
Najviša produkcija ostvarena je u podlozi sa izatin-3-hidrazonom, pri čemu je postignuta maksimalna koncentracija od 75 µg/ml nakon 96 h. Približne koncentracije, niže za 5 i 8 % (71 i 69 µg/ml), postignute su u podlogama sa izatin-3-tozilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom nakon 120 h. U sva tri slučaja, gde su postignute najviše maksimalne koncentracija, ostvarena je identična specifična brzina stvaranja proizvoda od 1,7 mg/g/d. U svim podlogama, osim u podlozi sa izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom, u kojoj je dobijeno najmanje azalomicina B (33 µg/ml), postignute su više koncentracije nego što je postignuto u podlozi sa triptofanom (37 µg/ml), čime je potvrđeno stimulatívno dejstvo derivata izatina na produkciju antibiotika.



a)



b)



c)

Slika 4.7 Promena koncentracije azalomicina B tokom fermentacije a) čistog i b) otpadnog glicerola SU i c) RU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom (◆), 5-hloroizatin-3-hidrazonom (■), 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom (▲), izatin-3-tozilhidrazonom (×), izatin-3-hidrazonom (\*), izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (●) i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom (+)



Tabela 4.3 Efekat triptofana i derivata izatina kao izvora azota na maksimalnu koncentraciju suve biomase (SBM), potrošnju glicerola ( $\Delta_{\text{glic}}$ ) kao i ostvarene maksimalne koncentracije ( $C_{\text{max}}$ ) i specifičnu brzinu stvaranja ( $q_p$ ) antibiotika heksaena H-85 i azalomicina B, tokom gajenja bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa glicerolom

Izvor azota	Karakteristike bioprocasa																				
	Čist glicerol			Otpadni glicerol SU <sup>a</sup>								Otpadni glicerol RU <sup>b</sup>									
	SBM	$\Delta_{\text{glic}}$		Heksaen H-85		Azalomicin B		SBM	$\Delta_{\text{glic}}$		Heksaen H-85		Azalomicin B		SBM	$\Delta_{\text{glic}}$		Heksaen H-85		Azalomicin B	
	$X_{\text{max}}$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$X_{\text{max}}$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$X_{\text{max}}$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$C_{\text{max}}$	$q_p$	$C_{\text{max}}$	$q_p$
g/l	mg/ml	%	$\mu\text{g/ml}$	mg/g/d	$\mu\text{g/ml}$	mg/g/d	g/l	mg/ml	%	$\mu\text{g/ml}$	mg/g/d	$\mu\text{g/ml}$	mg/g/d	g/l	mg/ml	%	$\mu\text{g/ml}$	mg/g/d	$\mu\text{g/ml}$	mg/g/d	
<b>Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>)</b>	9,3	6,2	42	149	2,3	38	0,6	8,7	5,22	36	151	2,4	32	3	6,9	3,8	27	141	2,8	37	0,7
<b>5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>)</b>	8,8	6,4	41	194	3,1	53	0,8	8,4	4,68	33	186	3,1	27	3	7,1	4,2	29	133	2,7	40	0,8
<b>5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)</b>	8,0	3,4	22	166	2,8	47	0,8	8,2	2,75	18	161	2,7	42	5	5,8	2,3	17	137	3,3	69	1,7
<b>Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)</b>	8,1	4,9	31	161	2,8	64	1,1	5,9	4,09	29	134	3,1	46	8	6,1	2,9	20	122	2,8	71	1,7
<b>Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)</b>	9,5	6,8	47	182	2,7	59	0,8	9,7	4,96	36	196	2,8	49	5	6,5	3,1	23	153	3,3	75	1,7
<b>Izatin-3-(4'-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)</b>	8,2	6,3	41	138	2,4	52	0,8	7,6	4,46	31	135	2,6	35	4	5,9	2,3	17	118	2,8	33	0,7
<b>5-hloroizatin-3 (4' hidroksi) benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)</b>	6,8	4,2	29	145	3	42	0,8	5,4	3,06	22	128	3,3	38	7	5,5	2,2	16	97	2,4	50	1,3

<sup>a</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz suncokretovog ulja.

<sup>b</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz repičinog ulja.

Veoma je teško naći vezu između strukture derivata izatina i produkcije antibiotika. Ostvareni rezultati, su pokazali da izatin-3-hidrazon i 5-hloroizatin-3-hidrazon imaju veći uticaj na produkciju heksaena H-85. Glavni deo strukture ovih jedinjenja je identičan, a jedina razlika je u supstituentu na poziciji 5, što znači da hlor, u ovom slučaju, nema negativan uticaj na produkciju antibiotika. S druge strane, derivati izatina bez supstituisanog hlora na poziciji 5 (izatin-3-tozilhidrazon i izatin-3-hidrazon), imaju bolji uticaj na produkciju azalomicina B. Glavna razlika kod izatin-3-tozilhidrazona jeste SO<sub>2</sub> grupa i aromatično jezgro, što znači da ove grupe ne smanjuju produkciju azalomicina B.

Uporedo sa rezultatima dobijenim ispitivanjem uticaja sličnih izvora azota (Ilić i sar., 2010b; Ilić i sar 2013), uticaj izatin-3-hidrazona, 5-hloroizatin-3-hidrazona, izatin-3-tozilhidrazona, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazona, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazona i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazona na produkciju antibiotika niži je od postignutog sa izatin-3-tiosemikarbazonom, izatin-3-semikarbazonom i izatin-3-fenilhidrazonom (Ilić i sar., 2010b; Ilić i sar., 2013). To je i očekivano, posebno kod izatin-3-tiosemikarbazona i izatin-3-semikarbazona, pošto je njihova struktura najbližnja strukturi triptofana.

## 4.3 Biosinteza ulja izolovanim slatkovodnim algama

### 4.3.1 Izolacija i identifikacija mikroalgi

U cilju dobijanja čistih sojeva mikroalgi koje bi bile gajene za dobijanje ulja, koje bi se moglo koristiti za proizvodnju biodizela, rađena je izolacija iz uzoraka vode slatkovodnih bara. Posebna pažnja je posvećena sojevima koji imaju sposobnost metabolisanja glicerola. Nakon 11 serija razblaženja i presejavanja (165 dana), izolovano je, prečišćeno i odabrano za dalja istraživanja 4 vrste mikroalgi koje su identifikovane na osnovu morfoloških karakteristika. Izolovani sojevi, okarakterisani su kao pripadnici rodova: *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* (slika 3.3). U stajaćim slatkim vodama naših prostora, najrasprostranjeniji i najzastupljeniji su pripadnici vrsta iz rodova *Chlorella*, *Scenedesmus* i *Chlorococcum* (Blaženčić, 2000.), tako da su ostvareni rezultati izolacije očekivani.

Pred pomenutih sojeva, izolovane su i mikroalge okarakterisane kao pripadnici rodova *Euglena*, *Clamydomonas* i *Coleastrum*, još dva izolata pripadnika *Chlorella*, dva izolata roda *Desmodesmus*, kao i cijanobakterije. Međutim, ovi izdvojeni sojevi nisu pokazali afinitete prema glicerolu ili je prilikom presejavanja i gajenja dolazilo do čestih kontaminacija kao posledica nedovoljne prečišćenosti, pa nisu korišćeni za dalja istraživanja.

### 4.3.2 Biosinteza ulja gajenjem izolata slatkovodnih algi na podlogama sa glicerolom

Rezultati proučavanja mogućnosti gajenja slatkovodnih jednoćelijskih algi u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom iz proizvodnje biodizela kao i rezultati autotrofnog gajenja (bez dodavanja organskog izvora ugljenika) (Cvetković, 2013) prikazani su u tabeli 4.4. Kinetika mikrobnog rasta i potrošnje glicerola tokom gajenja u podlogama sa a) čistim i b) otpadnim glicerolom SU i c) RU prikazana je slici 4.8 i 4.9.

Izolovane jednoćelijske alge su gajene pri konstantnom osvetljenju ( $100 \text{ w/m}^2$ ), tokom 30 dana u BBM podlozi u koju je dodavan glicerol ( $15 \text{ g/l}$ ), na rotacionoj mućkalici ( $140 \text{ min}^{-1}$ ), na temperaturi od  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vrednost apsorbance merene na  $\lambda = 620 \text{ nm}$ , nakon inokulacije, iznosila je približno  $0,05$  (Reda i sar 2011). U velikom broju objavljenih istraživanja, rast algi praćen je na  $\lambda = 680 \text{ nm}$  (Reda i sar 2011; Zhang i sar 2014). Međutim, izvođenjem probnih fermentacija, čiji rezultati nisu prikazani, utvrđeno je da nečistoće iz otpadnog glicerola stvaraju smetnje prilikom merenja, a dobijane vrednosti nisu bile realne, pa je zbog toga prihvaćeno da rast biomase algi bude praćen na  $\lambda = 620 \text{ nm}$ , na kojoj je takođe moguće efikasno pratiti mikrobni rast (Held 2011). Dok su alge izolovane, prečišćavane i gajene u podlogama za izolaciju, rađena su paralelna merenja apsorbanci na  $680$  i  $620 \text{ nm}$ , pri čemu je ustanovljeno da je jedina razlika u tome što su vrednosti dobijane na  $680 \text{ nm}$  za oko  $25 \%$  više.

#### 4.3.3 Promena koncentracije biomase algi u podlogama sa glicerolom

Alge u odgovarajućim uslovima (optimalan sadržaj hranljivih materija, optimalna temperatura i osvetljenost) autotrofno, rastu veoma brzo i mogu udvostručiti svoju biomasu u periodu od  $3 - 12 \text{ h}$ , a za rast im nije potreban organski izvor ugljenika jer koriste ugljenik(IV)-oksid (Svirčev, 2005). Prema tome, u ovom slučaju, glicerol nije bio limitirajući supstrat. Najviši rast algi zapažen je u podlozi sa čistim glicerolom, niži u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, dok je najniži rast zapažen u podlozi sa otpadnim glicerolom RU, što je i očekivano zbog sadržaja nečistoća koje inhibiraju rast, što je zapaženo i kod prethodno korišćenih mikroorganizama.

Na slici 4.8a, prikazan je rast izolovanih sojeva *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa čistim glicerolom. Kod svih sojeva, osim kod *Chlorococcum* kod kog je zapažen najviši i konstantan rast do kraja procesa, uočen je slab rast u prvih  $3$  do  $6$  dana kao i stagnacija nakon  $27$  dana. Najviše suve biomase ( $1,7 \text{ g/l}$ ) dobijeno je sa sojem *Chlorococcum*, zatim sa sojevima *Desmodesmus* i *Chlorella* ( $1,4 \text{ g/l}$  i  $1,1 \text{ g/l}$ ), dok je najmanje biomase ( $1 \text{ g/l}$ ) dobijeno sa sojem *Scenedesmus* (tabela 4.4).

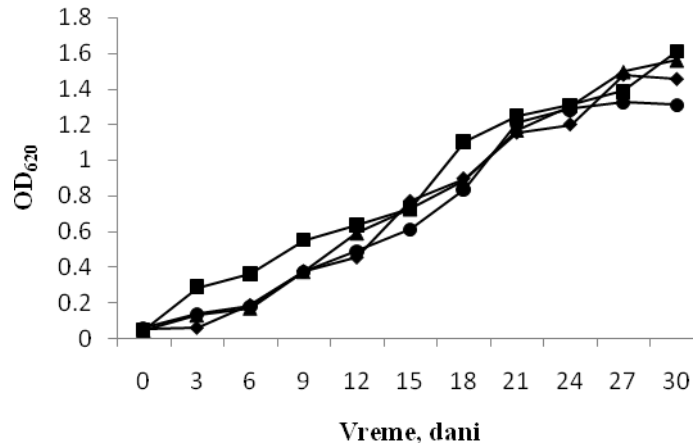
U odnosu na rezultate autotrofnog gajenja ovih izolovanih sojeva u regularnoj BBM podlozi (tabela 4.4) (Cvetković, 2013), u podlozi sa čistim glicerolom dobijeno je 20 % više suve biomase izolata algi *Chlorococcum*, 7 % odnosno 9 % manje kod sojeva *Desmodesmus* i *Chlorella*, dok je ista količina dobijena sa sojem *Scenedesmus*. Glicerol je imao stimulatívno dejstvo jedino na rast kod izolovanog soja *Chlorococcum*, neutralno dejstvo na soj *Scenedesmus*, a umereno negativno dejstvo na *Desmodesmus* i *Chlorella* izolovane sojeve.

Gajenjem izolovanih sojeva algi u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, postignut je niži rast nego što je bio slučaj sa čistim glicerolom. Ostvarene vrednosti suve biomasa izolovanih sojeva *Chlorella* i *Scenedesmus* niže su za 10 %, a vrednosti suve biomase sojeva *Chlorococcum* i *Desmodesmus* niže su za 18 i 15 %. Najviše suve biomase dobijeno je sa sojem *Chlorococcum* (1,4 g/l) a zatim sa sojevima *Desmodesmus* i *Chlorella* (1,2 i 1 g/l). Kao i u podlozi sa čistim glicerolom, najmanje suve biomase dobijeno je sa sojem *Scenedesmus* (0,9 g/l). Kinetika rasta algi u podlozi sa otpadnim glicerolom SU prikazana je na slici 4.8b.

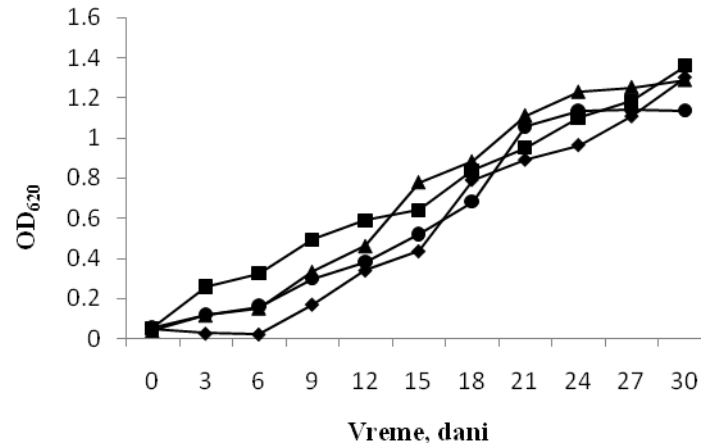
Zapaženo je da sojevi *Chlorella*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* slabo rastu u prvih 6 dana (faza uzdržanog rasta), nakon čega ulaze u eksponencijalnu fazu rasta, pri čemu sojevi *Desmodesmus* i *Scenedesmus* nakon 21 odnosno 22 dana ulaze u stacionarnu fazu, dok *Chlorella* raste do kraja procesa. Relativno dug period uzdržanog rasta, može se objasniti kao neophodno vreme potrebno algama za adaptaciju na negativan uticaj nečistoća iz otpadnog glicerola na rast. Soj *Chlorococcum*, kao i u podlozi sa čistim glicerolom, konstantno raste do kraja procesa.

U podlozi sa otpadnim glicerolom RU, zapažen je najslabiji rast algi. Sve vrednosti postignute suve biomase, niže su i od vrednosti postignutih u podlogama sa otpadnim glicerolom SU, pri čemu je kod soja *Scenedesmus* zapažen neznatno viši rast, a dobijena je ista koncentracija suve biomase (0,9 g/l). Međutim, za razliku od gajenja u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, kod soja *Scenedesmus*, zapažen je konstantan rast do kraja procesa.

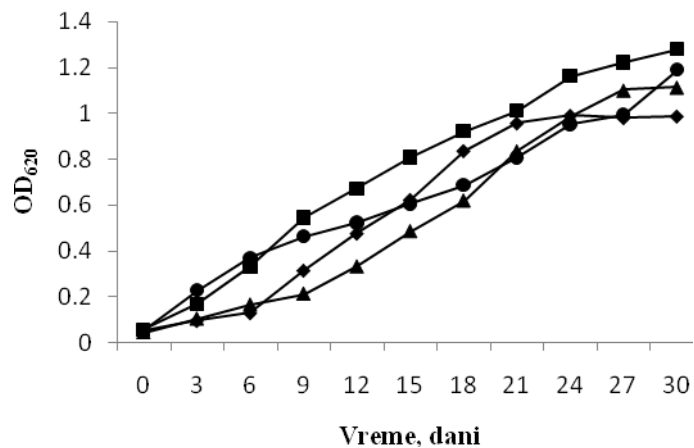
Slično gajenju u podlozi sa čistim i otpadnim glicerolom SU, soj *Chlorococcum* konstantno raste, s tim što je ostvarena vrednost suve biomase niža (1,3 g/l). Sojevi *Desmodesmus* i *Chlorella*, rastu umereno prvih 6 dana, nakon čega konstantno rastu do 27 odnosno 21 dan kada ulaze u stacionarnu fazu sa sadržajem suve biomase od 1 odnosno 0,7 g/l. Pored različite kinetike rasta u odnosu na podloge sa čistim i otpadnim glicerolom SU, izolovani soj *Chlorella* i najslabije raste u podlozi sa otpadnim glicerolom RU. Na slici 4.8c, prikazana je kinetika rasta izolovanih sojeva algi u BBM podlozi sa otpadnim glicerolom RU.



a)



b)



c)

Slika 4.8 Promena optičke gustine tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz roduva *Chlorella* (◆), *Chlorococcum* (■), *Desmodesmus* (▲) i *Scenedesmus* (●) u BBM podlozi sa a) čistim i b) otpadnim glicerolom SU i c) RU

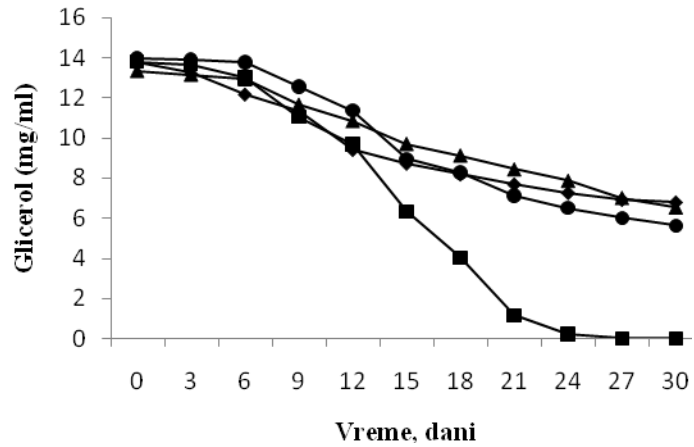
#### 4.3.4 Potrošnja glicerola

Na slici 4.9 prikazana je kinetika potrošnje glicerola u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU i RU. Tokom gajenja algi, zapaženo je da svi izolovani sojevi troše glicerol, odnosno da se tokom procesa koncentracija glicerola smanjuje. Najviši utrošak glicerola, uz određena odstupanja, zapažen je u podlogama sa čistim glicerolom, a potom sa otpadnim glicerolom SU i RU. Nije zapaženo da je potrošnja glicerola pratila rast algi, kao ni da je imala znatan uticaj na rast, čime je potvrđena činjenica da algama za rast nije neophodan organski izvor ugljenika (Makareviciene i sar., 2014; Svirčev, 2005). Zapaženo je da rast algi ne prati potrošnju glicerola.

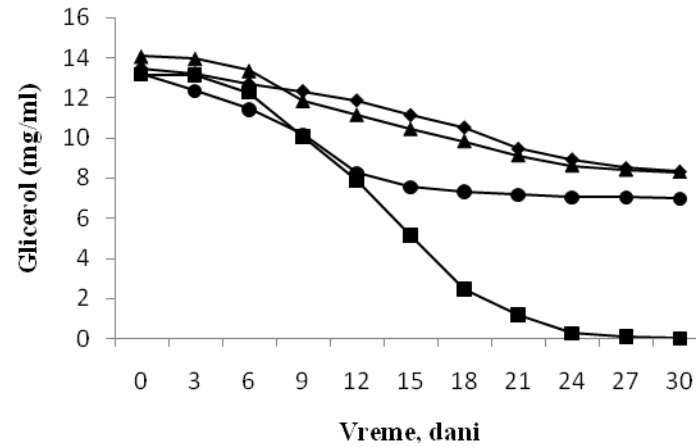
U svim podlogama, u odnosu na ostale proučavane alge, soj *Chlorococcum*, troši najviše glicerola. U podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU, do kraja procesa, potroši svu raspoloživu količinu glicerola. U obe podloge zapažena je značajna potrošnja glicerola tek nakon 6 dana, s tim što u podlozi s čistim glicerolom bude potrošen nakon 24 dana, a u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, iako u jako maloj količini, glicerol je prisutan do samog kraja procesa (slika 4.9a i 4.9b). U podlozi sa otpadnim glicerolom RU, soj *Chlorococcum* potroši 61 % od ukupne raspoložive količine glicerola. Značajna potrošnja glicerola zapažena je u periodu između 12 i 21 dan (slika 4.9c).

Izolovani soj okarakterisan kao pripadnik roda *Scenedesmus*, takođe najviše troši čist glicerol (59 %), zatim otpadni glicerol SU (47 %), a najmanje otpadnog glicerola RU (32 %). U podlozi sa čistim glicerolom, značajan pad koncentracije glicerola zapažen je tek nakon 6 dana, a potom konstantno opada do kraja procesa (slika 4.9a). U podlogama sa otpadnim glicerolom SU i RU, zapažen je konstantan blagi pad koncentracije glicerola od samog početka procesa, do 15 odnosno 18 dana, nakon čega nastavi neznatno da opada (slika 4.9b i 4.9c).

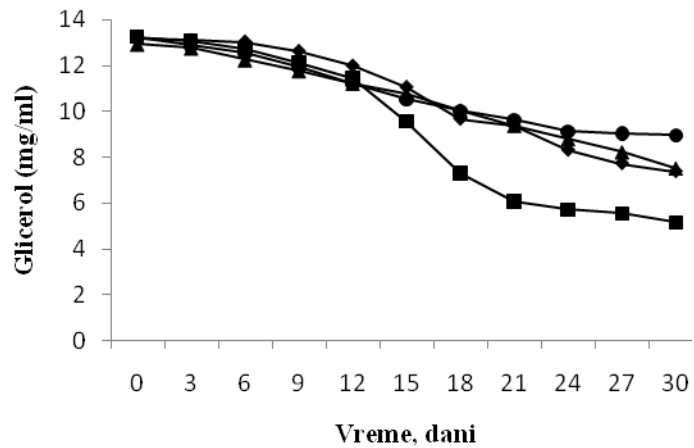




a)



b)



c)

Slika 4.9 Poromena koncentracije glicerola tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella* (◆), *Chlorococcum* (■), *Desmodesmus* (▲) i *Scenedesmus* (●) u BBM podlozi sa a) čistim i b) otpadnim glicerolom SU c) RU

U podlozi sa čistim glicerolom, sojevi *Chlorella* i *Desmodesmus* potroše približno istu količinu glicerola, odnosno 51 % od ukupne raspoložive količine (tabela 4.4). U oba slučaja, koncentracija glicerola neznatno opadne u prvih 3 do 6 dana, a potom lagano opada do kraja procesa (slika 4.9a).

U podlozi sa otpadnim glicerolom SU, sojevi *Chlorella* i *Desmodesmus* potroše 38 odnosno 41 % od ukupne količine glicerola, dok u podlozi sa otpadnim glicerolom RU potroše 44 odnosno 42 % glicerola. *Chlorella* troši veću količinu glicerola prilikom gajenja u podlozi sa otpadnim glicerolom RU, nego što je to slučaj sa gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, dok soj *Desmodesmus* troši neznatno veću količinu glicerola, gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom RU. Gajenjem ova dva soja u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, skoro identično, koncentracija glicerola opada lagano i konstantno tokom celog procesa, pri čemu kod gajenja soja *Desmodesmus*, koncentracija ostaje skoro nepromenjena u prva 3 dana (slika 4.9b). U podlozi sa otpadnim glicerolom RU, ova sličnost je još izražajnije (slika 4.9c).

#### 4.3.5 Sadržaj produkovanog ulja algi

Izolovani sojevi proizvode različite količine ulja prilikom gajenja u podlogama sa glicerolom, nevezano za brzinu mikrobnog rasta. Poznato je da alge nagomilavaju rezerve ulja u uslovima manje pogodnim za rast (Chisti, 2007; Sarmidi, 2009; Tredici, 2004). Bez obzira na slabiji rast u svim podlogama, u odnosu na sojeve *Chlorococcum* i *Desmodesmus*, *Chlorella* je proizvela najviše ulja. Sadržaj ulja u biomasi dobijenoj gajenjem u podlozi sa čistim glicerolom iznosio je 34 %, neznatno veći (35 %) u biomasi dobijenoj gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom SU, dok je najniži sadržaj ulja (30 %) dobijen gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom iz RU. U sva tri slučaja, produktivnost ulja bila je 0,4 g/l, 0,3 g/l odnosno 0,2 g/l.

Sadržaj ulja iz biomase dobijene gajenjem u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU, viši je od sadržaja ulja iz biomase dobijene gajenjem u osnovnoj BBM podlozi koji je iznosio 33 % (tabela 4.4), a sve dobijene vrednosti su u skladu sa vrednostima sadržaja ulja dobijenim u istraživanjima u kojima su gajeni neki od sojeva *Chlorella sp.* (26 - 47 %), pod isključivo autotrofnim uslovima (Amaro, 2011; Widjaja, 2009).

Sadržaj ulja dobijen iz suve biomase soja *Scenedesmus*, niži je od dobijenog kod soja *Chlorella* u svim podlogama, osim u podlozi sa otpadnim glicerolom, gde je nešto viši (31 %). Za razliku od soja *Chlorella*, soj *Scenedesmus* u suvoj biomasi dobijenoj gajenjem u podlogama sa otpadnim glicerolom SU i RU ima isti sadržaj ulja od 31 %, što je više nego u suvoj biomasi dobijenoj prilikom gajenja u podlozi sa čistim glicerolom (27 %).

Iako, manje povoljan za rast, otpadni glicerol je uticao na povećanje produkcije ulja. U sva tri slučaja, ostvarena je ista vrednost produktivnosti ulja od 0,3 g/l. U odnosu na vrednost sadržaja ulja u suvoj biomasi izolovanog soja *Scenedesmus*, od 29 % (tabela 4.4), dobijenog gajenjem u osnovnoj BBM podlozi, izuzev vrednosti dobijene u podlozi sa čistim glicerolom, koja je niža, vrednosti dobijene gajenjem u podlogama sa otpadnim glicerolom su više. Dobijene vrednosti više su i od objavljenih vrednosti dobijenim u istraživanjima sa sojevima roda *Scenedesmus* (12 – 29 % ) (Abou-Shanab, 2011; Amaro, 2011).

Sojevi *Chlorococcum* i *Desmodesmus* su najbolje rasli u svim podlogama sa glicerolom, ali su produkovali najmanje količine ulja. Gajenjem u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU soj *Chlorococcum* je pokazao dobar rast i utrošio je svu raspoloživu količinu glicerola, ali dobijeno je duplo manje ulja u odnosu na soj *Chlorella*, 17 odnosno 15 % od suve biomase. Soj *Chlorococcum*, pokazao je najslabiji rast i najmanje je glicerola utrošio u podlozi sa otpadnim glicerolom RU, ali je produkovao najviše ulja, 23 % u odnosu na suhu biomasu. Produktivnost ulja u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU iznosila je 0,3 g/l, 0,2 g/l i 0,3 g/l.

Ostvareni sadržaj ulja soja *Chlorococcum* gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom RU, znatno je viši od sadržaja ulja od 16 % dobijenog gajenjem u osnovnoj BBM podlozi (Cvetković, 2013), dok je sadržaj ulja dobijen gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom neznatno viši, a u podlozi sa otpadnim glicerolom neznatno niži. U odnosu na podatke iz dostupne literature gde je objavljeno da je se sadržaj ulja u suvoj biomasi nekih sojeva roda *Chlorococcum* kreće od 3 do 19 % (Amaro, 2011; Mata i sar., 2010) jedino je gajenjem u podlozi sa otpadnim glicerolom RU postignut viši sadržaj ulja.

Produktivnost ulja soja *Desmodemus* bila je ista u sve tri podloge i iznosila je 0,3 g/l i isti sadržaj ulja u suvoj biomasi od 22 % ostvaren je u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU, dok je u podlozi sa otpadnim glicerolom RU zapažen viši sadržaj ulja odnosno 28 %. I u ovom slučaju, podloga koja je bila nepogodnija za rast i u kojoj je utrošeno manje glicerola, pokazala se kao pogodnija za produkciju ulja. U odnosu na dobijene rezultate gajenjem u osnovnoj BBM podlozi, gde je dobijeni sadržaj ulja iznosio 23 % (tabela 4.4), vrednosti dobijene u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU, neznatno su niže, dok je u podlozi sa otpadnim glicerolom RU dobijeno više ulja. Sve dobijene vrednosti sadržaja ulja, gajenjem izolovanog soja *Desmodemus* u podlogama sa glicerolom, niže su u odnosu na postignute i objavljene rezultate istraživanja sa nekim sojevima roda *Desmodemus* gde je objavljivano da je postignut sadržaj ulja i do 50 % u odnosu na suhu biomasu (Pan i sar., 2011).

Tabela 4.4 Ostvarene maksimalne vrednosti suve biomase (SBM), potrošnje glicerola ( $\Delta$ Glic), prinosa ( $Y_{P/X}$ ) i sadržaja ulja u suvoj biomasi, tokom autotrofnog (u podlozi bez glicerola) i heterotrofnog gajenja algi (u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom SU i RU)

Karakteristike bioprocasa																							
Autotrofno gajenje									Heterotrofno gajenje														
Izolovani .SOJ	-			Čist glicerol						Otpadni glicerol SU <sup>a</sup>					Otpadni glicerol RU <sup>b</sup>								
	(Cvetković, 2013)			SBM		$\Delta$ glic		Ulje		SBM		$\Delta$ glic		Ulje		SBM		$\Delta$ glic		Ulje			
	g/l	$Y_{P/X}$	%	g/l	mg/ml	%	$Y_{P/X}$	%	g/l	mg/ml	%	$Y_{P/X}$	%	g/l	mg/ml	%	$Y_{P/X}$	%	g/l	mg/ml	%	$Y_{P/X}$	%
							g/l						g/l										
<i>Chlorella sp.</i>	1,2	0,4	33	1,1	6,97	51	0,4	34	1,0	5,11	38	0,3	35	0,7	5,79	44	0,2	30					
<i>Chlorococcum sp.</i>	1,5	0,2	16	1,7	13,77	100	0,3	17	1,4	13,14	100	0,2	15	1,3	8,07	61	0,3	23					
<i>Desmodesmus sp.</i>	1,5	0,4	23	1,4	6,80	51	0,3	22	1,2	5,76	41	0,3	22	1,0	5,43	42	0,3	28					
<i>Scenedesmus sp.</i>	1,0	0,3	29	1,0	8,31	59	0,3	27	0,9	6,20	47	0,3	31	0,9	4,23	32	0,3	31					

<sup>a</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz suncokretovog ulja.

<sup>b</sup> Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela iz repičinog ulja.

## 5 ZAKLJUČCI

Proučavanjem mogućnosti mikrobiološkog iskorišćenja otpadnog glicerola dobijenog u proizvodnji biodizela u cilju dobijanja komercijalnih mikrobioloških proizvoda, odnosno mlečne kiseline pomoću bakterije *Enterococcus faecalis* MK3-10A, antibiotika (heksaen H-85 i azalomicin B) pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 i ulja pomoću jednoćelijskih algi izolovanih iz slatkovodnih bara, dobijeni su rezultati koji su podsticajni za dalja istraživanja i koji su u skladu sa podacima iz literature. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

1. Bakterija *Enterococcus faecalis* MK3-10A najbolje raste u podlozi sa glukozom i u podlozi sa čistim glicerolom i glukozom kao izvorom ugljenika. Bez obzira na slabiji rast, najveća produkcija mlečne kiseline (14,64 mg/ml/d) ostvarena je gajenjem u podlozi koja je sadržala otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela od suncokretovog ulja kao jedini izvor ugljenika. Zbog toga, glicerol suncokretovog ulja može se posmatrati kao značajan izvor ugljenika za dalja istraživanja mogućnosti gajenja bakterije mlečne kiseline.

2. Najniži rast, potrošnja izvora ugljenika i produkcija mlečne kiseline bakterije *E. faecalis* MK3-10A, ostvareni su u podlogama koje su sadržale otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela od repičinog ulja, pa je neophodno dodatno prečišćavanje i obrada ovog izvora ugljenika kako bi se, pre svega, mogao koristiti za dalja istraživanja a potom i za primenu, kao izvor ugljenika u bioprocesima dobijanja mlečne kiseline.

3. Gajenjem u podlogama sa glukozom, čistim i otpadnim glicerolom dobijenim iz proizvodnje biodizela od suncokretovog i repičinog ulja, kao i u podlogama u kojima je glukoza kombinovana sa glicerolom, bakterija *E. faecalis* MK3-10A nije proizvela značajnu količinu mlečne kiseline, pa se samim tim nije pokazala kao dobar producent mlečne kiseline.

4. Bakterija *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 slabije raste koristeći otpadni glicerol kao izvor ugljenika i u znatno manjoj meri (približno dvostruko manje) ga troši nego glukozu.

5. Gajenjem u osnovnoj podlozi sa otpadnim glicerolom dobijenim u proizvodnji biodizela od suncokretovog ulja kao izvorom ugljenika, *S. hygroscopicus* CH-7 postiže najvišu koncentraciju antibiotika heksaena H-85 koja je za 10 % viša od postignute u osnovnoj podlozi sa glukozom, odnosno prinos je povećan 1,3 puta, dok je u podlozi sa otpadnim glicerolom repičinog ulja ostvaren identičan prinos, ali niža maksimalna koncentracija.

6. Korišćenjem otpadnog glicerola dobijenog proizvodnjom biodizela od suncokretovog i repičinog ulja kao izvor ugljenika, dobijene su niže koncentracije (71 % i 37 % niže) i prinos (3,1 i 1,1 puta niži) antibiotika azalomicina B, nego što je dobijeno korišćenjem glukoze i čistog glicerola.

7. Triptofan i derivati izatina, nemaju značajan uticaj na povećanje potrošnje otpadnog glicerola kao, i na rast bakterije *S. hygroscopicus* CH-7, a sve ostvarene maksimalne koncentracije suve biomase, niže su u odnosu na postignutu gajenjem u osnovnoj podlozi sa glukozom.

8. Dodatak triptofana i derivata izatina u osnovnu podlogu, umesto sojinog brašna kao izvor azota, ima stimulatивно dejstvo na produkciju oba ispitivana antibiotika, prilikom gajenja bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa otpadnim glicerolom iz proizvodnje biodizela, kao izvor ugljenika.

9. Uz korišćenje triptofana i derivata izatina kao izvor azota, otpadni glicerol dobijen u proizvodnji biodizela od suncokretovog ulja pokazao se kao pogodniji izvor ugljenika za produkciju heksaena H-85, dok je za produkciju azalomicina B pogodniji otpadni glicerol dobijen iz proizvodnje biodizela od repičinog ulja.

10. Kao najpogodniji izvor azota za produkciju oba antibiotika, gajenjem u podlogama sa otpadnim glicerolom, pokazao se izatin-3-hidrazon, sa kojim su ostvarene najviše koncentracije oba antibiotika. Najviša vrednost koncentracije heksaena H-85 ostvarena je u podlozi sa otpadnim glicerolom dobijenim u proizvodnji biodizela od suncokretovog ulja, što je 1,2 puta više od vrednosti ostvarene u podlozi sa otpadnim glicerolom suncokretovog ulja i sojinim brašnom, a 1,3 puta viša od vrednosti ostvarene u osnovnoj podlozi sa sojinim brašnom i glukozom. U podlozi sa glicerolom repičinog ulja i izatin-3-hidrazonom ostvarena je najviša maksimalna koncentracija azalomicina B, koja je 3 puta veća od maksimalne koncentracije ostvarene u podlozi sa glicerolom repičinog ulja i sojinim brašnom, a približno 2 puta veća od maksimalne koncentracije ostvarene u osnovnoj podlozi sa sojinim brašnom i glukozom.

11. Izolovane jednoćelijske slatkovodne alge slabije rastu u podlogama sa otpadnim glicerolom iz proizvodnje biodizela u odnosu na podloge sa čistim glicerolom, kao i osnovnu podlogu bez izvora ugljenika. Otpadni glicerol dobijen u proizvodnji biodizela od repičinog ulja pokazao se kao manje pogodan za gajenje algi od otpadnog glicerola suncokretovog ulja, pri čemu je postignuti sadržaj suve biomase bio niži za 7-30 %. Nasuprot tome, u tako dobijenoj suvoj biomasi algi, sadržaj ulja bio je veći za 27 - 53 %, osim kod soja *Scenedesmus* sa kojim su ostvarene identične vrednosti sadržaja suve biomase i ulja. Poznato je da u manje pogodnim uslovima za rast, alge proizvode veću količinu ulja, što je potvrđeno i u ovom istraživanju.

12. Izolovani soj algi, okarakterisan kao pripadnik roda *Chlorococcum*, pokazao je najbolji rast u primenjenim uslovima i troši svu raspoloživu količinu čistog i otpadnog glicerola dobijenog u proizvodnji biodizela od suncokretovog ulja, kao i značajnu količinu glicerola repičinog ulja, (61 %), ali u odnosu na ostale izolovane sojeve algi proizvode najmanje ulja u svim podlogama. Iako je u podlozi sa otpadnim glicerolom repičinog ulja pokazao slabiji rast i manju potrošnju istog, proizvodio je 1,3 odnosno 1,5 puta više ulja u njoj.



13. Izolovani sojevi okarakterisani kao pripadnici sojeva *Chlorella* i *Scenedesmus*, slabije rastu i koriste manje glicerola, ali su se pokazali kao značajni i najpogodniji producenti ulja prilikom gajenja u podlogama sa čistim i otpadnim glicerolom iz proizvodnje biodizela od suncokretovog i repičinog ulja, ostvarujući 27-35 % ulja u suvoj biomasi. Prema dobijenim rezultatima, ova dva soja je potrebno podvrgnuti daljim proučavanjima u cilju stvaranja uslova za praktičnu primenu u proizvodnji ulja algi.

14. Otpadni glicerol iz proizvodnje biodizela od repičinog ulja se pokazao kao najmanje pogodan izvor ugljenika za gajenje bakterija *E. faecalis* MK3-10A i *S. hygroscopicus* CH-7 zbog nečistoća koje sadrži. Zbog toga, potrebno je prečišćavanje pre primene, osim u slučaju produkcija antibiotika azalomicina B pomoću bakterije *S. hygroscopicus* CH-7 uz dodatak derivata izatina kao izvor azota, kao i u slučaju produkcije ulja pomoću slatkovodnih jednoćelijskih algi. Nasuprot tome, otpadni glicerol suncokretovog ulja može se koristiti bez prečišćavanja jer je za produkciju mlečne kiseline, antibiotika heksaena H-85 i produkciju ulja algi bio efikasniji od čistog glicerola kao izvora ugljenika.

## 6 LITERATURA

Abou-Shanab R.A.I., Matter I.A., Kim S.N., Oh J., Choi J., Jeon B.H., Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake, *Biomass Bioenergy* 35 (2011) 3079-3085.

Adlercreutz P., Oxygen supply to immobilized cells: 5. Theoretical calculations and experimental data for the oxidation of glicerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with oxygen or *p*-benzoquinone as electron acceptor, *Biotechnol. Bioeng.* 28(2) (1986) 223-232.

Ahmad A.L., Mat Yasin N.H., Derek C.J.C., Lim J.K., Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production :a review, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 15 (2011) 584–93.

Ahmad A.L., Mat-Yasin N.H., Derek C.J.C., Lim J.K., Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 15 (2011) 584–93.

Alcantara R., Amores J., Canoira L., Franco M.J., Navarro A., Catalytic production of biodiesel soy-beanoil, used frying oil and tallow, *Biomass Bioenergy* 18 (2000) 515–27.

Alhanash A., Kozhevnikova E.F., Kozhenikov I.V., Gas phase dehydration of glicerol to acrolein catalyzed by caesium heteropoly salt, *Appl. Catal.* 378 (2010) 11–8.

Álvarez M., Medina R., Pasteris S., Strasser de Saad A., Sesma F., Glicerol metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: Cloning and expression of two glicerol kinase genes, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7(4) (2004) 170-181.

Amaral P.F.F., Ferreira T.F., Fontes G.C., Coelho M.A.Z., Glicerol valorization: new biotechnological routes, *Food Bioprod. Process.* 87 (2009) 179–186.

Amaro H.M, Guedes A.C., Malcata F.X., Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *J. Appl. Energ.* 88 (2011) 3402–3410.

Amin I.N.H.M., Mohammad A.W., Markom M., Peng L.C., Hilal N., Analysis of deposition mechanism during ultrafiltration of glycerin-rich solutions, *Desalination* 261 (2010) 313–20.

Ampaitopin S., Tetsuo T., A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock, *Energy* 35 (2010) 2493–504.

Antolín G., Tinaut F.V., Briceño Y., Castaño V., Pérez C., Ramírez A.I., Optimization of biodiesel production by sunflower oil transesterification, *Bioresour. Technol.* 83 (2002) 111–114.

Aransiola E.F., Lipase catalysed ethanolysis of *Jatropha* oil for biodiesel production, *Energ. Envir. Res.* 3 (2013) 180–9.

Arai M., Azalomycins B and F. Two new antibiotics, *J. Antibiot. Ser A* 13 (1960) 51–56.

Arruda P.V., Felipe M.G., Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*, *Curr. Microbiol.* 58 (2008) 274–278.

Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., Strahan G.D., Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) biopolymers, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 88 (2011) 949–959.

Atadashi I.M., Aroua M.K., Abdul-Aziz A.R., Sulaiman N.M.N., The effects of catalysts in biodiesel production: A review, *J. Ind. Eng. Chem.* 19 (2013) 14–26.

Athalye S.K., Garcia R.A., Wen Z., Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 2739–2744.

Axelsson L., Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects*, Marcel Dekker, USA, (1998) 1-72.

Aydin H., Bayindir H., Performance and emission analysis of cottonseed oil methyl ester, *Renew. Energ.* 35 (2010) 588-592.

Babu N.S., Sree R., Prasad P.S.S., Lingaiah N., Room-temperature transesterification of edible and nonedible oils using a heterogeneous strong basic Mg/La catalyst, *Energy Fuels* 22 (2008) 1965–1971.

Baek R.O., Jeong W.S., Sun Y.H., Won K.H., Lian H.L., Min J.H., Don H.P., Chul H.K., Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3918–3922.

Bajaj A., Lohan P., Jha P.N., Mehrotra R., Biodiesel production through lipase-catalyzed transesterification: an overview, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 62 (2010) 9–14.

Banković-Ilić I.B., Ivan J.S., Olivera S.S., Vlada B.V., Yung-Tse H., Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 32 (2014)238–254.

Banković-Ilić I.B., Olivera S. S.,Vlada B.V., Biodiesel production from non-edible plant oils, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 16 (2012) 3621– 3647.

Baras J., Veljković V., Popov S., Povrenović D., Lazić M. Zlatković B. Osnovi Bioprocenog Inženjerstva, Univerzitet u Nišu, Leskovac (2009) 69-137.

Barclay W.R., Meager K.M., Abril J.R., Heterotrophic production of long-chain omega-3-fatty-acids utilizing algae and algae-like microorganisms, *J. Appl. Phycol.* 6 (1994) 123–129.

Bauer R., Katsikis N., Varga S., Hekmat D., Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 28(1) (2005) 37-43.

Blaženčić J., *Sistematika algi*, NNK International Beograd, 2000.

Bonato J.A., Headridge J.B., Morrison R.J., University of South Pacific, Library Cataloguingin Publication Data, 1987.

Bories A., Himmi E., Jauregui J.J.A., Pelayo-Ortiz C., Gonzales V.A., Glicerol fermentation with *Propionibacteria* and optimization of the production of propionic acid, *Sci. Aliment.* 24 (2004) 121–135.

Bories A., Claret C., Soucaille P. Kinetic study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glicerol using *Gluconobacter oxydans*, *Process Biochem.* 26 (4) (1991) 243-248.

Bournay L., Casanave D., Delfort B., Hillion G., Chodorge J.A., New heterogeneous process for biodiesel production: a way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants, *Catal. Today* 106 (2005) 190–192.

Branchey L.B., Branchey M., Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids decrease feelings of anger in substance abusers, *Psychiatry Res.* 157 (2008) 95-104.

Brandão L.V., Assis D.J., López J.A., Espiridião M.C.A., Echevarria E.M., Druzian J.I., Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: Xanthan production and characterization, *Braz. J. Chem. Eng.* 30 (2013) 737-746.

Brandão L.V., Nery T.B.R., Druzian J.I., Produção de polissacarídeo tipo goma xantana por *Xanthomonas* em meio fermentativo com glicerol ou glicerina. *Rev. Propr. Ind. INPI.* PI0705950-7 A2 (2007).

Brandner A., Lehnert K., Bienhonz A., Lucas M., Claus P., Production of biomass derived chemicals and energy: chemocatalytic conversion of glicerol, *Top.Catal.* 52 (2009) 278–87.

Brakhage A.A., Al-Abdallah Q., Tüncher A., Spröte P., Evolution of  $\beta$ -lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors, *Phytochemistry* 66 (11) (2005) 1200–1210.

Brennan L., Owende P., Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 14 (2010) 557–577.

Brown D.A., Bishop J., Halliwell S.N., Glycerine as an alternative dielectric medium, IEE Colloquium (Digest) 30 (1999) 31-33.

Bub G., Mosler J., Sabbach A., Kuppinger F., Nordhoff S., Stochniol G., Acrylic acid, water-absorbent polymer structures based on renewable resources and method for producing said structure, International Patent WO 092272 A2, 2006.

Carvalho M., Matos M., Roca C. Reis M.A.M., Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethylsulfoxide as electron acceptor, New Biotechnol. 31, (1) (2014) 133-139.

de Castro J.S., Nguyen L.D., Seppala J., Bioconversion of commercial and waste glycerol into value-added polyhydroxyalkanoates by bacterial strains, J. Microb. Biochem. Technol. 6(6) (2014) 337-345.

Cenci G., Rossi J., Throtta F., Caldini G., Lactic acid bacteria isolated from dairy products inhibit genotoxic effect of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-chromotest, Syst. Appl. Microbiol. 25(4) (2002) 483-90.

Cerrate S., Yan F., Wang Z., Coto C., Sacakli P., Waldroup P.W., Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers, Int. J. Poult. Sci. 5 (2006) 1001-1007.

Chae K.J., Kang S.W., Lim J.S., Song Y.S., Kim S.W., Stimulation of Cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum* M35 with fatty acids, J. Microbiol. Biotechnol. 16 (7) (2006) 1120-1124.

Chattopadhyay S., Karemora A., Das S., Deysarkar A., Sen R., Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics, Appl. Energy 88 (2011) 1251-1256.

Chatzifragkou A., Makri A., Belka A., Bellou S., Mayrou M., Mastridou M., Mystrioti P., Onjaro G., Aggelis G., Papanikolaou S., Biotechnological conversion of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species, Energy 36 (2011) 1097-1108.

Chevalier M., Lin E.C.C., Levine R.L. Hydrogen peroxide mediates the oxidative inactivation of enzymes following the switch from anaerobic to aerobic metabolism in *Klebsiella pneumoniae*, J.Biol. Chem. 265(1) (1990) 40-46.

Chi Z., Pyle D., Wen Z., Frear C., Chen S., A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation, Process Biochem. 42 (2007) 1537–1545.

Chin H. J., Shen T.F., Su H.P., Ding S.T., *Schizochytrium limacinum* SR-21 as a source of docosahexaenoic acid: optimal growth and use as a dietary supplement for laying hens, Aust. J.Agric. Res. (2006) 57(2006) 13–20.

Chisti Y., Biodiesel from microalgae, Biotechnol. Adv. 25 (2007) 294-306.

Cho S., Kim T., Woo H.M., Kim Y., Lee J., Um Y., High production of 2,3- butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1, Biotechnol. Biofuels 8 (2015) 146.

Choi W.J., Hartono M.R., Chan W.H., Yeo S.S., Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 89 (2011) 1255–1264.

Choubisa B., Patel H., Patel M., Dholakiya B., Microbial production of lactic acid by using crude glycerol from biodiesel, J. Microbiol. Biotechnol. Res. 2 (1) (2012) 90-93.

Clacens J.M., Pouilloux Y., Barrault J., Selective etherification of glycerol to polyglycerols over impregnated basic MCM-41 type mesoporous catalysts, Appl. Catal. A 227(1-2) (2002) 181-190.

Claret C., Salmon J.M., Romieu C., Bories A., Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol, Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 (1994) 359–365.

Colleta P., Arnaud H., Laurent L., Monique R., Romy-Alice G., Jean-Philippe S., Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 207–214.

Cvetković J., Izolacija i gajenje mikroalgi za proizvodnju ulja, Master rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac (2013)

Da Rós P.C.M., Silva G.A.M., Mendes A.A., Santos J.C., de Castro H.F., Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matricestobe used in biodiesel synthesis from different feed-stocks, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5508–5516.

Danilović B., Avramović J., Ćirić J., Savić D., Veljković V., Production of biodiesel from microalgae, *Chem. Ind.* 68 (2) (2014) 213-232.

Danquah M.K., Gladman B., Moheimani N., Forde G.M., Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency, *Chem. Eng. J.* 151 (2009) 73–78.

Dasari M.A., Kiatsimkul P.P., Sutterlin W.R., Suppes G.J., Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol, *Appl. Catal. A* 281(1-2) (2005) 225-231.

De Ley J., Frateur J., The status of the generic name *Gluconobacter*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20 (1970) 83–95.

Demirbas A., Conversion of biomass using glycerin to liquid fuel for blending gasoline as alternative engine fuel. *Energy Convers. Manage.* 41(16) (2000) 1741-1748.

Demirbas A., *Biodiesel, a realistic fuel alternative for diesel engines*, Springer-Verlag, London, 2008.

Demirel G.S., Lucas M., Claus P., Liquid phase oxidation of glycerol over carbon supported gold catalysts, *Catal.Today* 102–103 (2005) 166–172.



Desplanques S., Renou F., Grisel M., Malhiac C., Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids* 27 (2012) 401-410.

Dias J.M., Alvim-Ferraz M.C.M., Almeida M.F., Díaz J.D.M., Polo M.S., Utrilla J.R., Biodiesel production using calcium manganese oxide as catalyst and different raw materials, *Energy Convers. Manag.* 65 (2013) 647–653.

Dias J.M., Alvim-Ferraz M.C.M., Almeida M.F., Díaz J.D.M., Polo M.S., Utrilla J.R., Selection of heterogeneous catalysts for biodiesel production from animal fat, *Fuel* 94 (2012) 418–425.

Doi Y., l-Lactate production from biodiesel - derived crude glycerol by metabolically engineered *Enterococcus faecalis*: cytotoxic evaluation of biodiesel waste and development of a glycerol-inducible gene expression system, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 2082–2089.

Donkin S.S., Koser S.L., White H.M., Doane P.H., Cecava M.J., Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 92 (2009) 5111-5119.

Elibol M., Ulgen K., Kamaruddin K., Mavituna F., Effect of inoculums type on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Biotechnol. Lett.* 17 (6) (1995) 579-582.

Encinar J.M., Sánchez N., Martínez G., García L., Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 10907–10914.

Esders T. W., Michrina C. A., Purification and properties of L-alpha-glycerolphosphate oxidase from *Streptococcus faecium*. *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 2710–2715.

Ethier S., Woisard K., Vaughan D., Wen Z.Y., Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 88-93.

Fakas S., Papanikolaou S., Batsos A., Galiotou-Panayotou M., Mallouchos A., Aggelis G., Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*, *Biomass Bioenergy* 33 (2009) 573–580.

Fan X.H., Burton R., Zhou Y.C., Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals—mini review, *Open Fuels Energy Sci. J.*(2010) 3 (2010) 17–22.

Feng X., Ding Y., Xian M., Xu X., Zhang R., Zhao G., Production of optically pure d-lactate from glycerol by engineered *Klebsiella pneumoniae* strain, *Bioresour. Technol.* 172 (2014) 269-275.

Fonte E.S., Amado A.M., Meirelles-Pereira F., Esteves F.A., Rosado A.S., Farjalla V.F., The combination of different carbon sources enhances bacterial growth efficiency in aquatic ecosystems, *Microb. Ecol.* 66(4) (2013) 871-878.

Furman T., Nikolić R., Nikolić M., Tomić M., Savin L., Ponovo aktuelni biodizel, *Savremena poljoprivredna tehnika*, 28 (2002) 14-22.

Gabriele C., Rutger A.S., *Catalysis for renewables: from feedstock to energy production.* Wiley-VCH Weinheim (2007) 229-230.

Ganesan D., Rajendran A., Thangavelu V., An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts, *Rev. Envir. Sci. Biotechnol.* 8 (2009) 367–394.

Ganesh M., Senthamarai A., Shanmughapriya S., Natarajaseenivasan K., Effective production of low crystallinity poly(3-hydroxybutyrate) by recombinant *E. coli* strain JM109 using crude glycerol as sole carbon source, *Bioresour. Technol.* 192 (2015) 677–681.

Garlapati V. K., Shankar U., Budhiraja A., Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products, *Biotechnol. Reports* 9 (2016) 9–14.

Gerpen J.V., Biodiesel processing and production, *Fuel Process. Technol.* 86 (2005) 1097–1107.

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

Gilliland S.E., Probiotics, *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Vol. 8, Elsevier, London (2003).

Glycerine: an overview, The soap and detergent association, Glycerine and Oleochemical Division, 475 Park Avenue South, New York, New York 10016 (1990) 1-27.

González-Pajuelo M., Andrade J.C., Vasconcelos I., Production of 1,3- propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (2005a) 391–396.

González-Pajuelo M., Meynial-Salles I., Mendes F., Andrade J.C., Vasconcelos I., Soucaille P., Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glicerol, *Metab. Eng.* 7 (2005b) 329–336

Gopal P.K., *Lactobacillus acidophilus*, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3 (2003) 1484–1488.

Gottschalk G., *Bacterial metabolism*, New York: Springer-Verlag (1986).

Gupta A., Murarka A., Campbell P., Gonzalez R., Anaerobic fermentation of glicerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 5871–5883.

Guerrero-Perez O.M., Rosas J.M., Bedia J., Cordero T., Recent inventions in glicerol transformations and processing, *Recent Pat. Chem. Eng.* 2 (2009)11–21.

Gunstone F., *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., (2004) 1-36.

Haag R., Sunder A., Stumbe J., An approach to glicerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 2954–2955.

Haas M.J., Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. *Fuel Process. Technol.* 86 (2005) 1087–96.

Hajek M., Skopal F., Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3242–3245.

Hampy K.R., Kellogg D.W., Coffey K.P., Kegley E.B., Caldwell J.D., Lee M.S., Akins M.S., Reynolds J.L., Moore J.C., Southern K.D., Glycerol as a Supplemental Energy Source for Meat Goats, *AAES Research Series* 553 (2008) 63-64.

Hara M., Environmentally benign production of biodiesel using heterogeneous catalysts, *Chem. Sus. Chem.* 2 (2009) 129–35.

Hardie J.M. Whiley R.A., Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, *J. Appl. Microbiol.* 83 (1997) 1-11.

Hasheminejad M., Tabatabaei M., Mansouroanah Y., Khatami M., Javani A., Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 461–468.

Hazimah A.H., Ooi T.L., Salmiah A., Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch, *J. Oil Palm Res.* (2003)15(2003)1–5.

Held P., Monitoring of Algal Growth Using their Intrinsic Properties, Application note, *Biofuel Research*, AN 11.7.2011.

Hering J.S., Garrean T.R., Dekoj A., Razzak A., Saied J., Trevino T., Babcock A., Espat N.J., Inhibition of proliferation by omega-3 fatty acids in chemoresistant pancreatic cancer cells, *Annals of Surgical Oncology* 14(12) (2007) 3620-3628.

Himmi E.H., Bories A., Boussaid A., Hassani L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 (2000) 435-440.

Hong A.A., Cheng K.K., Peng F., Zhou S., Sun Y., Liu C.M., Liu D.H., Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 1576–1581.

Huang Y., Zheng H., Yan Y., Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 504–515.

Holm A.K., Investigation of glycerol assimilation and cofactor metabolism in *Lactococcus lactis*, PhD. Thesis, Technical University of Denmark, Department of Systems Biology, Denmark (2012).

Honda D., Yokochi T., Nakahara T., Erata M., Higashihara T., *Schizochytrium limacinum* *sp. nov.*, a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean, *Mycol. Res.* 102(4) (1998) 439-448.

Huycke M.M., Physiology of *Enterococci*. In: Gilmore M.S., Clewell D.B., Courvalin P., Dunny G.M., Murray B. E., Rice L.B. (Eds.) *The Enterococci pathogenesis*, Molecular Biology and Antibiotic Resistance, ASM Press, Washington DC (2002) 133–175.

Huesemann M.H., Benemann J.R., Biofuels from Microalgae: Review of Products, Processes and Potential, with Special Focus on *Dunaliella sp.*, Book, Ben-Amotz A., Polle J.E.W., Subba Rao D.V., Science Publishers, New Hampshire, United States(US), (2009).

Huong L.T.T., Tan P.M., Hoa T.T.V., Biodiesel production from fat of tra catfish via heterogeneous basic-catalyzed transesterification using ultrasonic mixing, *E-J Surf. Sci. Nanotech.* 9 (2011) 477–481.

Ibrahim M.H.A., Steinbüchel A., Poly (3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrifican* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 6222-6231.

Ilić B.S., Konstantinović S.S., Savic S.D., Veljković V.B., Gojgić-Cvijović G., The impact of Schiff bases on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*, *Med. Chem. Res.* 19 (2010a) 690-697.

Ilić S.B., Konstantinović S.S., Veljković V.B., Savić D.S., Gojgić-Cvijović G., The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 in: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Formatex, Spain (2010b).

Ilić S., Uticaj sastava i reoloških svojstava hranljive podloge na kinetiku produkcije antibiotika pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac (2010).

Ilić S.B., Konstantinović S.S., Gojgić-Cvijović G., Savić D.S., Veljković V.B., The impact of glicerol and some carbohydrates on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, *Med. Chem. Res.* 22 (2013) 934-937.

Innis S. M., Fatty acids and early human development, *Early Hum. Dev.* 83 (2007) 761–766.

Imandi S.B., Bandaru V.R., Somalanka S.R., Garapati H.R., Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glicerol using Doehlert experimental design, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1367–1372.

Isahak W.N.R.W., Ismail M., Yarmo M.A., Jahim J.M., Salimon J., Purification of crude glicerol from transesterification RBD palm oil over homogeneous catalysts for the biolubricant preparation, *Asian J. Appl. Sci.* 10 (2010) 2590–2595.

Israel A.U., Obot I.B., Asuquo J.E., Recovery of glicerol from spent soap lye by-product of soap manufacture, *E-J.Chem.* 5 (2008) 940–945.

Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N., Hydrogen and ethanol production from glicerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process, *J. Biosci. Bioeng.* 100(3) (2005) 260-265.

Iverson S.J., Lang S.L.C., Cooper M.H., Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue, *Lipids* 36 (2001) 1283–1287.

Ivy J.L., Effect of pyruvate and dihydroxyacetone on metabolism and aerobic endurance capacity, *Med.Sci. Sports Exercise* 30(6) (1998) 837-843

Janaun J., Ellis N., Perspectives on biodiesel a sustainable fuel, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 14 (2010) 1312–1320.

Jiang Y., Liu W., Zou H., Cheng T., Tian N., Xian M., Microbial production of short chain diols, *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) 65.

Jensen T.O., Kvist T., Mikkelsen M.J., Christensen P.V., Westermann P., Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *Clostridium pasteurianum*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012a) 709–717.

Jensen T.O., Kvist T., Mikkelsen M.J., Westermann P., Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol, *AMB Express* 2 (1) (2012b) 44.

Joković N., Diverzitet mlečno kiselinskih bakterija izolovanih iz kajmaka, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd (2010).

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

Jung J.Y., Yun H.S., Lee J.W., Oh M.K., Production of 1,2-propanediol from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2011) 846–853.

Jurac Z., Optimiranje proizvodnje biodizela iz otpadnih jestivih ulja s obzirom na zahtjeve kvalitete, Doktorska disertacija, Sveučilište u Rijeci, Tehnički fakultet, Rijeka, 2011.

Kamzolova S.V., Fatykhova A.R., Dedyukhina E.G., Anastassiadis S.G., Golovchenko N.P., Morgunov I.G., Citric acid production by yeast grown on glycerol-containing waste from biodiesel industry, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2011) 65–74.

Kansedo J., Lee K.T., Bhatia S., *Cerbera odollam* (seamango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production, *Fuel Process. Technol.* 88 (2009) 1148–1150.

Karadžić I., Gojgić-Cvijović G., Vučetić J., Hexaene H-85, A hexaene H-85 macrolide complex, *J. Antibiot.* 12 (1991) 1452–1453.

Karunakaran S., T. Mithra, R. Shobiya, N. Abibunisha, Batch Study of Lactic Acid Production from Crude Glycerol Using *Bacillus sp.* (KF781350), *Int. J. Emerging Technol. Adv. Eng.* 4 (2014) 636-640.

Kerr B.J., Dozier W.A., Bregendahl K., Nutritional value of crude glycerin for nonruminants, *Proceedings of the 23rd Annual Carolina Swine Nutrition Conference Raleigh, NC* (2007) 6-18.

Kim M., Di Maggio C., Yan S., Wang H., Salley S.O., Ng K.Y.S., Performance of heterogeneous ZrO<sub>2</sub> supported metaloxide catalysts for brown grease esterification and sulfur removal, *Bioresour. Technol.* 102 (2011a) 2380–2386.

Kim N.J., Hui Li, Kwonsu J., Ho N.C., Pyung C.L., Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11 Original Research Article, *Bioresour. Technol.* 102 (2011b) 7466-7469.

Knothe G., *The Biodiesel Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition, Champaign, Illinois (2005) 34-268.

Koganti S., Kuo T.M., Kurtzman C.P., Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield, *Appl. Microbiol. Cell Physiol.* 90 (2011) 257–267.

Koh M.Y., Mohd G.T.I., A review of biodiesel production from *Jatropha curcas L.* Oil, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 15 (2011) 2240-2251.



Koller M., Bona R., Braunegg G., Hermann C., Horvat P., Kroutil M., Martinz J., Neto J., Pereira L., Varila P., Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules* 6(2) (2005) 561-565.

Kongjao S., Purification of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant, *Korean J.Chem. Eng.* 27 (2010) 944–949.

Konstantinović S.S., Danilović B.R., Ćirić J.T., Ilić S.B., Savić D.S., Veljković V.B., Valorization of crude glycerol produced in biodiesel production, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* (2016), DOI:10.2298/CICEQ160303019K.

Konstantinović S.S., Radovanović B.C., Sovilj S.P., Stanojević S.S., Antimicrobial activity of some isatin-3-thiosemicarbazone complexes, *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (2008) 7-13.

Konstantinović S.S., Sinteza, struktura i antimikrobna aktivnost koordinacionih jedinjenja izatin-Schif-ovih baza, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, (2007).

Kośmider A., Białas W., Kubiak P., Drożdżyńska A., Czaczyk K., Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs, *Bioresour. Technol.* 105 (2012) 128–133.

Kośmider A., Leja K., Czaczyk K., Improved utilization of crude glycerol by-product from biodiesel production. In *Biodiesel-quality, emissions and byproducts*, Montero G, Stoytcheva M., Eds., Croatia: InTech (2011) 341–364.

Kulkarni M.G., Dalai A.K., Waste cooking oil - an economical source for biodiesel: a review, *Ind. Eng.Chem. Res.* 45 (2006) 2901–2913.

Kulshrestha A.S., Gao W., Gross R.A., Glycerol co-polyesters: Control of branching and molecular weight using a lipase catalyst, *Macromolecules* 38(8) (2005) 3193-3204.

Kumar G., Kumar D., Poonam J.R., Singh C.P., Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 923–927.

Kumar S., Chaubea A., Jain S.K., Sustainability issues for promotion of *Jatropha* biodiesel in Indian scenario: a review, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 16 (2012) 1089–1098.

Kumar P., Ray S., Patel S.K.S., Lee J.K., Kalia V.C., Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions, *Int. J. Biol. Macromol.* 78 (2015) 9–16.

Kumari V., Shah S., Gupta M.N., Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*, *Energy Fuels* 21 (2007) 368–372.

Kumari P., Reddy C.R.K., Jha B., Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae, *Anal. Biochem.* 415 (2) (2012) 134–144.

Lam M.K., Lee K.T., Mohamed A.R., Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 500–518.

Lammers P.J., Kerr B.J., Weber T.E., Dozier W.A., Kidd M.T., Bregendahl K., Honeyman M.S., Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs, *J. Anim. Sci.* 86 (2008) 602–608.

Lang X., Dalai A.K., Bakhshi N.N., Reaney M.J., Hertz P.B., Preparation and characterization of biodiesels from various biooils, *Bioresour. Technol.* 80 (2001) 53–62.

Lara P.A.V., Park E.Y., Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth, *Process Biochem.* 38 (2003) 1077–1082.

Leblanc, *Enterococcus: Physiology and Genetics, Prokaryotes*, Springer, Amazon, 4 (2006) 175–204.

Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N., Kinetic study on succinic acid and acetic acid formation during continuous cultures of *Anaerobiospirillum succiniproducens* grown on glycerol, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 30 (2010) 2143–2146.

Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N., Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniproducens* using glycerol as a carbon, 72(1) (2001) 41-48.

Li Z., Li X., Wang Y., Wang Y., Wang F., Jiang J., Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9810–9813.

Leroy F., De Vuyst L., Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 67–78.

Liang Y., Cui Y., Trushenski J., Blackburn J.W., Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7581–7586.

Liu Y., Lotero E., Goodwin Jr J.G., Mo X., Transesterification of poultry fat with methanol using Mg–Al hydrotalcite derived catalysts, *Appl. Catal. A-Gen.* 331 (2007) 138–48.

Lopez J.A.S., Santos A.M., Perez A.F.C., Martin M.A., Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 5609–5615.

Maervoet V.E.T., Beauprez J., de Maeseneire S.L., Soetaert W.K., de Mey M., *Citrobacter werkmanii*, a new candidate for the production of 1,3-propanediol: strain selection and carbon source optimization, *Green Chem.* 14 (2012) 2168– 2178.

Makareviciene V., Skorupskaite V., Gumbyte M., Biomass and oil content of *Chlorella sp.*, *Haematococcus sp.*, *Nannochloris sp.* and *Scenedesmus sp.* under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol, *J. Appl. Phycol.* 26 (2014) 83 – 90.

Mahesh M., Meenakshi N., Effect of carbon and nitrogen source for the production of tetracycline analysis by using HPLC, *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 4 (2013) 218–223.

Manosak R., Limpattayanate H.S., Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant *via* a combined process of chemical and adsorption, *Fuel Process. Technol.* 92 (2001) 92–99.

Mario P., Michele R., *Future of glycerol*. 2nd ed. Royal Society of Chemistry, London (2010) 1-17.

Maru B.T., Constanti M., Stchigel A.M., Medina F., Sueiras J.E., Biohydrogen production by dark fermentation of glycerol using *Enterobacter* and *Citrobacter sp*, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 31–38.

Masson S., Latini R., Tacconi M., Bernasconi R., Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies, *J. Cardiovas. Med.* 8 (1) (2007) 4-10.

Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew Sustainable Energy Rev.* 14 (2010) 217–232.

Mazumdar S., Clomburg, J.M., Gonzalez R., *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of d-lactic acid from glycerol, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 4327-4336.

Meneghetti S.M.P., Meneghetti M.R., Wolf C.R., Silva E.C., Lima G.E.S., Silva L.L., Biodiesel from castor oil: a comparison of ethanolysis *versus* methanolysis, *Energy Fuels* 20 (2006) 2262–2265.

Metsoviti M., Zeng A.-P., Koutinas A.A., Papanikolaou S., Enhanced 1,3- propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses, *J. Biotechnol.* 163 (2013) 408–418.

Mićić R., Tomić M., Simikić M., Zarubica A., Biodiesel from rapeseed variety "Banaćanka" using KOH catalyst, *Chem. Ind.* 67 (4) (2013) 629–637.

Moazami N., Ashori A., Ranjbar R., Tangestani M., Eghtesadi R., Sheykhi Nejad A., Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*, *Biomass Bioenergy* 39 (2012) 449–53.

Moazami N, Ranjbar R., Ashori A., Tangestani M., Sheykhi Nejad A., Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island, *Biomass Bioenergy* 35 (2011) 1935–1939.

Modi M.K., Reddy J.R.C., Rao B.V.S.K., Prasad R.B.N., Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 637–640.

Moon S.K., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W., Production of fumaric acid using rice bran and subsequent conversion to succinic acid through a two-step process, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 115 (2004) 843– 856.

Moraes I.C.F., Fasolin L.H., Cunha R.L., Menegalli F. C., Dynamic and steady-shear rheological properties of xanthan and guar gums dispersed in yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), *Braz. J. Chem. Eng.*, 28 (2010) 483-494.

Morris E. R., Nishinari K., Rinaudo M., Gelation of gellan - A review, *Food Hydrocolloids* 28 (2012) 373-411.

Mu Y., Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL. Microbial production of 1,3- propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1755–1759.

Murakami N., Oba M., Iwamoto M., Tashiro Y., Noguchi T., Bonkohara K., Abdel-Rahman MA., Zendo T., Shimoda M., Sakai K., Sonomoto K., L-Lactic acid production from glycerol coupled with acetic acid metabolism by *Enterococcus faecalis* without carbon loss, *J. Biosci. Bioeng.* 121 (1) (2016) 89-95.

Mustapić Z., Krička T., Stanić Z., Biodiesel as alternative engine fuel, *Energy* 55(6) (2006) 634-657.

Mutreja V., Singh S., Ali A., Biodiesel from mutton fat using KOH impregnated MgO as heterogeneous catalysts, *Renewable Energy* 36 (2011) 2253–2258.

Nabe K., Izuo N., Yamada S., Chibata I., Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*, *Appl. Env. Microbiol.* 38 (1979) 1056–1060.

Nagata M., Kiyotsukuri T., Ibuki H., Tsutsumi N., Sakai W., Synthesis and enzymatic degradation of regular network aliphatic polyesters, *React. Funct. Polymers* 30 (1-3) (1996) 165-171.

Nakagawa Y., Shinmi Y., Shuichi K., Tomishige K., Direct hydrogenolysis of glycerol into 1,3-propanediol over rhenium-modified iridium catalyst, *J. Catal.* 272 (2010) 191–194.

Nanda M.R., Yuan Z., Qin W., Poirier M.A., Chunbao X., Purification of crude glycerol using acidification: Effects of acid types and product characterization, *Austin. Chem. Eng.* 1 (2014) 1004-1011.

Ogier J.C., Serror, P., Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus, *Int. J. Food. Microbiol.* 126 (2008) 291-301.

Ohtake S., Wang Y.J., Trehalose: current use and future applications, *J. Pharm. Sci.* 100 (6) (2011) 2020–2053.

Okano K., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives and limits, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(3) (2010) 413- 423.

de Oliveira D., Di Luccio M., Faccio C., Rosa C.D., Bender J.P., Lipke N., Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 115 (2004) 771–80.

Ooi T.L., Yong K.C., Hazimah A.H., Dzulkefty K., Wan-Yunus W.M.Z., Crude glycerin recovery from glycerol residue waste from a palm kernel oil methyl ester plant, *J. Oil Palm Res.* 13 (2001) 16–22.

Ozsezen A.N., Canakci M., The emission analysis of an IDI diesel engine fueled with methyl ester of waste frying palm oil and its blends, *Biomass Bioenergy* 34 (2010) 1870-1878.

Pachauri N., He B., Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities, meeting presentation, Paper number: 066223. American Society of Agricultural and Biological Engineers (2006).

Pan Y.Y., Wang S.T., Chuang, L.T., Chang Y.W., Chen C.N.N., Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 10510–10517.

Pappalardo F., Fragalà M., Mineo P.G., Damigella A., Catara A.F., Palmeri R., Rescifina A., Production of filmable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates produced from glycerol by *Pseudomonas mediterranea*, *Int. J. Biol. Macromol.* 65 (2014) 89–96.

Papanikolaou S., Ruiz-Sanchez P., Pariset B., Blanchard F., Michel F., High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain, *J. Biotechnol.* 77 (2000) 191–208.

Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol, *J. Appl. Microbiol.* 92 (2002) 737-744.

Papanikolaou S., Aggelis G., Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78 (2003) 542-547.

Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis G., Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil, *Biomass Bioenergy* 32 (2008) 60-71.

Papanikolaou S., Aggelis G., Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*, *Lipid Technol.* 21 (2009) 83-87.

Perosa A., Tundo P., Selective hydrogenolysis of glycerol with Raney Nickel. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44(23) (2005) 8535-8537.

Pinzi S., Garcia I.L., Lopez-Gimenez F.J., Luquede Castro M.D., Dorado G., Dorado M.P., The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications, *Energy Fuels* 23 (2009) 25–41.

Pott R.W.M., Howe C.J., Dennis J.S., Photofermentation of crude glycerol from biodiesel using *Rhodospseudomonas palustris*: Comparison with organic acids and the identification of inhibitory compounds, *Bioresour. Technol.* 130 (2013) 725–730.

Prada-Palomo Y.P., Vanegas M.R., Ruíz P.D., Velasco D.M., Luna C.G., Lactic acid production by *Lactobacillus sp.* from biodiesel derived raw glycerol, *Cienc. Tecnol. Futuro* 5 (2012) 57-66.

Premanathan M., Radhakrishnan S., Kulangiappar K., Singaravelu G., Thirumalaiarasu V., Sivakumar T., Kathiresann K., Antioxidant and anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl, *Indian J. Med. Res.* 136 (2012) 822-826.

Priscilla A.S., Joe M.P., Wallis A.L., Bruce E.L., Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 104 (2009) 1098-106.

Pyle D.J., Garcia R.A., Wen Z., Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: Effects of Impurities on DHA production and algal biomass composition, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3933-3939.



Pyle D.J., Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for the Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids by the Microalga *Schizochytrium limacinum*, Phd thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University (2008).

Rahul M., Matti K., Ville S., Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen, *Int. J. Hydrogen Energy* 37 (2012) 12198–12204.

Randal W., *Technical Handbook for Marine Biodiesel*, Cito Culture Environmental Biotechnology US, Second Edition, US Department of Energy (1999).

Rattleff S., Heterologous protein production in *Streptomyces lividans*, Phd thesis, Technical University of Denmark, Denmark (2013).

Raya I., Yusi A. R., Seniwati D., The chlorophyll production and hydrogen produced potency by phytoplankton *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, and *Porphyridium cruentum*, *J. Nat. Sci. Res.* 5 (2015) 70-77.

Reda A.I., Matter I., Abou-Shanab A., Kim S.N., Kwan Y.O., Choi J., Jeon B.H., Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake, *Biomass Bioenergy* 35 (2011) 3079-3085.

Reddy C.R.V., Oshel R., Verkade J.V., Room-temperature conversion of soybean oil and poultry fat to biodiesel catalyzed by nanocrystalline calcium oxides, *Energy Fuel* 20 (2006) 1310–1314.

Revin V.V., Kasatkin S.A., Cherkasova G.N., Nikolaev V.T., Iamashkina N.S., Chabushkina M.N., Popova O.A., Belianina V.F., Effect of the quality of fat substrate on the dynamics of fatty acid utilization during biosynthesis of cephalosporin C, *Antibiot. Khimioter.* 36(1) (1991) 5-8.

Reyes J.F., Sepu'lveda M.A., PM-10 emissions and power of a diesel engine fueled with crude and refined Biodiesel from salmon oil, *Fuel* 85 (2006) 1714–1719.

Rodolfi L., Zittelli G.C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 100–112.

Rossi M.D., Berne da Costa J., Aquino de Souza E., Ruaro P.M.C., Marco A.M., Ayub Z., Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia, *Renew. Energ.* 39 (2012) 223-227.

Ruhal R., Choudhury B., Use of an osmotically sensitive mutant of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for the simultaneous productions of organic acids and trehalose from biodiesel waste based crude glycerol, *Bioresour. Technol.* 109 (2012a) 131-139.

Ruhal R., Choudhury B., Improved trehalose production from biodiesel waste using parent and osmotically sensitive mutant of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* under aerobic conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012b) 1153–1160.

Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratistavia K1, *Chem. Pap.* 62 (2008) 239-246.

Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed- batch cultures of *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 377-380.

Rywińska A., Rymowicz W., Żłarowska B., Biosynthesis of Citric Acid from Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica* in Fed-Batch Fermentation, *Food Technol. Biotechnol.* 47 (2009) 1-6.

Sabourin-Provost G., Hallenbeck P.C., High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3513–3517

Sabra W., Groeger C., Sharma P.N., Zeng A.P., Improved *n*-butanol production by a non-acetone producing *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525 in mixed substrate fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (9) (2014) 4267–4276.

Salah, R.B., Chaari K., Besbes S., Blecker C., Attia H., Production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 by fermentation of date juice palm by-products (*Phoenix dactylifera L.*), *J. Food Process Eng.*, 34 (2011) 457-474.

Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T.T., Bourtoom T., Potential use of the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids, *Process Biochem.* 46 (2011) 210–218.

Santos S.M., Carbajo J.M., Villar J.C., The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration, *BioResources* 8 (2013) 3630-3645.

Saravanan N., Puhan S., Nagarajan G., Vedaraman N., An experimental comparison of transesterification process with different alcohols using acid catalysts, *Biomass Bioenergy* 34 (2010) 999–1005.

Sarma S.J., Brar S.K., Sydney E.B., Bihan Y.L., Buelna G., Soccol C.R., Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review, *Int. J. Hydrogen Energy* 37 (2012) 6473–6490.

Sarmidi A., Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae, *Energy Convers. Manage.* 50 (2009) 1834–1840.

Saurabh J.S., Gurpreet S.D., Hinder K.B., Yann L.B., Gerardo B., Mausam V., Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407, *Renew. Energy* 60 (2013) 566–571.

Scholten E., Renz T., Thomas J., Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1947–1951.

Sánchez Ó.J., Cardona C.A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 5270–5295.

Sathianachiyara S., Devaraj A., Biopolymer production by bacterial species using glicerol, a byproduct of biodiesel, *Int. J. Sci. Res. Publ.* 3 (2013) 1-5.

Schieck S.J., Shurson G.C., Kerr B.J., Johnston L.J., Evaluation of glicerol, a biodiesel coproduct, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality, *J. Anim. Sci.* 88 (2010) 3927-3935.

Scholten E., Renz T., Thomas J., Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glicerol by *Basfia succiniciproducens* DD1, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1947–1951.

Schuchardt U., Sercheli R., Vargas M.R., Tranesterification of vegetable oil: a review, *J. Braz. Chem. Soc.* 9 (1998) 199–210.

Sdrula N., A study using classical or membrane separation in the biodiesel process, *Desalination* (2010) 250 (2010) 1070–1072.

Serna-Cock L., Rodríguez-de Stouvenel A., Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 5(1) (2005) 54 – 56.

Shah S., Sharma S., Gupta M.N., Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil, *Energy Fuels* 18 (2004) 154–159.

Shawn D.S., Glicerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle, *Rev. Bras. Zootec.* 37 (2008) 280–286.

Shin H.Y., Lee J.Y., Choi H.S., Lee J.H., Kim S.W., Production of cephalosporin C using crude glicerol in fed-batch culture of *Acremonium chrysogenum* M35, *J. Microbiol.* 49(5) (2011) 753-758.

da Silva N.L., Maciel M.R.W., Batistella C.B., Filho R.M., Optimization of biodiesel production from castor oil, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129 (2006) 405–414.

da Silva G.P., Mack M., Contiero J., Glicerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnol. Adv.* 2 (2009a) 30–39.

da Silva N.L., Batistella C.B., Filho R.M., Maciel M.R.W., Biodiesel production from castor oil: optimization of alkaline ethanolysis, *Energy Fuels* 23 (2009b) 5636–5642.

Simopoulos A.P., Essential fatty acids in health and chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 560–569.

Singh S.P., Singh D., Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review, *Renewable Sustainable Energy Rev.* (2009) 14 (2009) 200–216.

Slinn M., Kendall K., Mallon K., Andrews J., Steam reforming of biodiesel by product to make renewable hydrogen, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 5851–5858.

Soriano N.U., Venditti R., Argyropoulos D.S., Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification, *Fuel* 88 (2009) 560–565.

Speight J.G., *Chemical process and design handbook*, United States, McGraw- Hill Professional, (2002) (2.251) 309-312.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., Commercial applications of microalgae, *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2006) 87-96.

Sree R., Babu N.S., Prasad P.S.S., Lingaiah N., Transesterification of edible and non-edible oils over basic solid Mg/Zr catalysts, *Fuel Process. Technol.* 90 (2009) 152–157.

Sriram D., Yogeeswari P., Meena K., Synthesis, anti-HIV and antitubercular activities of ihn derivatives, *Pharmazie*, 61 (2006) 274-277.

Stamatelatou K., *Advanced oil crop biorefineries*, Cambridge RSC Publishing (2011) 1-47.

Stein J., (ED.) Handbook of Phycological methods, Culture methods and growth measurements, Cambridge University Press (1980) 448.

Stumbe J.F., Bruchmann B., Hyperbranched polyesters based on adipic acid and glycerol. *Macromol. Rapid Commun.* 25(9) (2004) 921-924.

Su E., You P., Wei D., *In situ* lipase-catalyzed reactive extraction of oilseeds with short-chained dialkyl carbonates for biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 5813–5817.

Svirčev Z., Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad (2005).

Swami S.M., Abraham M.A., Integrated catalytic process for conversion of biomass to hydrogen, *Energy Fuels* 20 (2006) 2616–2622.

Swati K., Arun G., Vijayanand S.M., Production of *n*-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite, *Fuel* 112 (2013) 557–561.

Szymanowska-Powalowska D., Białas W., Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSP1 from crude glycerol, *BMC Microbiol.* 10 (2014) 14-45.

Tabernero A., Martín del Valle E., Galán M., Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture, *Biochem. Eng. J.* 63 (2012) 104–115.

Taconi K.A., Venkataramanan K.P., Johnson D.T., Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013™ utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source, *Environ. Prog. Sustain. Energ.* 28 (2009) 100–110.

Takagi M., Karseno S., Yoshida T., Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells, *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2006) 223-226.

Tamalampudi S., Talukder M.R., Hama S., Numata T., Kondo A., Fukuda H., Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst, *Biochem. Eng. J.* 39 (2008) 185–189.

Tan H.W., Abdul-Aziz A.R., Aroua M.K., Glycerol production and its applications as a raw material: A review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 27 (2013) 118–127.

Tang X., Tan Y., Zhu H., Zhao K., Shen W., Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *E. coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 1628–1634.

Taufiq-Yap Y.H., Lee H.V., Hussein M.Z., Yunus R., Calcium-based mixed oxide catalysts for methanolysis of *Jatropha curcas* oil to biodiesel, *Biomass Bioenergy* 35 (2011) 827–834.

Thompson J.C., He B.B., Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks, *Appl. Eng. Agr.* 22 (2006) 261–265.

Tian K., Chen X., Shen W., Prior B.A., Shi G., Wang Z., High-efficiency conversion of glycerol to d-lactic acid with metabolically engineered *Escherichia coli*, *Afr. J. Biotechnol.* 11 (2012) 4860-4867.

Tongboriboon K., Cheirsilp B., H-Kittikun A., Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 67 (2010) 52–59.

Tredici M.R., Mass Production of Microalgae: Photobioreactors, *Handbook of microalgal culture: Biotechnol. Appl. Phycol.* Richmond A., Blackwell Science (2004) 178-184.

Ueoka H., Katayama T., Process for preparing glycerol, United States Patent 6288287 (2001).

Usta N., Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection dieselengine. *Biomass Bioenergy* 28 (2005) 77–86.

Veljkovic V.B., Lakicevic S.H., Stamenkovic O.S., Todorovic Z.B., Lazic M.L., Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids, *Fuel* 85 (2006) 2671–2675.

Villegas C.G., Santos V.E., Zazo M., Garcia J.L., Garcia-Ochoa F., Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition, *J. Biotechnol.* 131 (2007) S102.

Vodnar D.C., Dulf F.V., Pop O.L., Socaciu C., L (+)-Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol, *Microb. Cell Fact.*, 12 (2013) 92–101.

Vučetić J., Gojgić-Cvijović G., Karadžić I., The identification of the polyether antibiotic produced by *Actinomyces* sp. 468, *J. Serb. Chem. Soc.* 56 (1991) 581–586.

Vučetić J., Karadžić I., Gojgić-Cvijović G., Radovanović E., Improving hexaene H-85 production by *Streptomyces hygroscopicus*, *J. Serb. Chem. Soc.* 59 (1994) 973–9803.

Vyas A.P., Subrahmanyam N., Patel P.A., Production of biodiesel through transesterification of *Jatropha* oil using KNO<sub>3</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solid catalyst, *Fuel* 88 (2009) 625–628.

Wall J., Comparison of methods for the purification of biodiesel, Master's thesis, University of Idaho (2009).

Wang X.D., Li S.R., Wang H., Liu B., Ma X.B., Thermodynamic analysis of glycerin steam reforming, *Energy Fuels* 22 (2009) 4285–4291.

Wang Y., Wang X., Liu Y., Ou S., Tan Y., Tang S., Refining of biodiesel by ceramic membrane separation, *Fuel Processing Technology* 90 (2009) 422–427.



Wang W., Thermodynamic analysis of glycerol partial oxidation for hydrogen production, *Fuel Processing Technology* 91(2010) 1401–1408.

Wang Y., Zhang L., Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzym* 62 (2010) 91–96.

Watanabe M., Iida T., Aida T.M., Inomata H., Acrolein synthesis from glycerol in hot-compressed water, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 1285–1290.

Werpy T., Frye J., Zacher A., Miller D., Hydrogenolysis of 6-carbon sugars and other organic compounds, US Patent 6841085 B2 (2002).

Widjaja A., Chien C.C., Ju Y.H., Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 40 (2009) 13–20.

Wilkins E., Ringel A.K., Hortig D., Willke T., Vorlop K.-D., High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1057–1063.

Wolfson A., Dlugy C., Glycerol as an alternative green medium for carbonyl compound reductions, *Org. Commun.* 2 (2009) 34-41.

Yadav S., Rawat G., Tripathi P., Saxena R.K., A novel approach for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using glycerol: a low cost substrate, *Renewable Energy* 71 (2014) 37–42.

Yaguchi T., Tanaka S., Yokochi T., Nakahara T., Higashihara T., Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium sp.* Strain SR21. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (11) (1997) 1434-1434.

Yang B., Verkman A.S., Water and Glycerol Permeabilities of Aquaporins 1–5 and MIP Determined Quantitatively by Expression of Epitope-tagged Constructs in *Xenopus oocytes*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16140-16146.

Yang C., Jiang P., Xiao S., Zhang C., Lou K., Xing X.H., Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein production from glycerol, *Biochem. Eng. J.* 57 (2011) 55–62.

Yang F., Hanna M.A., Sun A., Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production, *Biotechnol. Biofuel.* 5(13) (2012) 1-10.

Yang G., Tian J., Li J., Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1017–1024.

Yazdani S.S., Gonzalez R., Engineering *E. coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products, *Metab. Eng.* 10 (2008) 340–351.

Yazdani S.S., Gonzalez R., Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 213–219.

Yong K.C., Ooi T.L., Dzulkefly K., WanYunus W.M.Z., Hazimah A.H., Refining of crude glycerine recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation, *J. Oil Palm Res.* 13 (2001) 39–44.

Yung C.L., Xue J.C., Chi Y.H., Ying J.Y., Jo S.C., Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria, *Int. J. Hydrogen Energy* 38 (35) (2013) 1–8.

Zabeti, M., Wan-Daud W.M.A., Aroua M.K., Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review, *Fuel Process. Technol.* 90 (2009) 770–777.

Zhao Y.N., Chen G., Yao S.J., Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*, *Biochem. Eng. J.* 32 (2006) 93–99.

Zhang A., Yang S.T., Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*, *Process Biochem.* 44 (2009) 1346–1351.

Zhang H., He Y., Li S., Liu X., Synthesis and hydrolytic degradation of aliphatic polyesteramides branched by glycerol, *Polym. Degrad. Stab.* 88(2) (2005) 309-316.

Zhang S., Liu P., Yang X., Hao Z., Zhang L., Luo N., Shi J., Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao, *Biomass Bioenergy* 66 (2014) 197-203.

Zhang X., Shanmugam K.T., Ingram L.O., Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *E. coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 2397–2401.

Zhang Y., Li Y., Du C., Liu M., Cao Z., Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*, *Metab. Eng.* 8 (2006) 578–586.

Zhanyou C., Denver P., Zhiyou W., Craig F., A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation, *Process Biochem.* 42 (2007) 1537–1545.

Zhou Y., Nie K., Zhang X., Liu S., Wang M., Deng L., Wang F., Tan T., Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. *Bioresour. Technol.* 163 (2014) 48–53.

Zheng-Xiang W., Jian Z., Huiying F., Bernard A. P., Glycerol production by microbial fermentation, *Biotechnol. Adv.* 19 (2001) 201–223.

Zhu C., Nomurg C.T., Perrotta J.A., Stipanovic A.J., Nakas J.P., Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Biotechnol. Prog.* 26 (2009) 424–430.

Zeng A.P., Biebl H., Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 74 (2002) 239–259.

Zeng X., Wang S., Jing K., Zhang Z., Lu Y., Use of biodiesel-derived crude glycerol for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis* XMU-VS01, *Eng. Life Sci.* 13 (1) (2013) 109-116.

Zong-Ming Z., Yun-Zhen X., Hong-Juan L., Ni-Ni G., Zhong-Zhen C., De-Hua L., Physiological mechanisms of sequential products synthesis in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by *Klebsiella pneumoniae*, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 923–932.

## 7 PRILOG

Tabela 7.1 Promena optičke gustine (biomase) bakterije *E. faecalis* MK3-10A tokom fermentacije u podlozi MRS sa glukozom i MRS podlogama sa glukozom i čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

OD 620													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1	0,056	0,084	0,162	0,286	0,391	0,484	0,524	0,598	0,641	0,703	0,791	0,805	0,811
2	0,037	0,048	0,126	0,228	0,316	0,422	0,498	0,564	0,621	0,667	0,716	0,720	0,723
3	0,063	0,069	0,101	0,184	0,268	0,388	0,491	0,557	0,613	0,664	0,689	0,700	0,703
4	0,081	0,091	0,104	0,132	0,211	0,254	0,314	0,375	0,426	0,488	0,515	0,548	0,561

1- Glukoza (20 g/l); 2- Glukoza + čist glicerol (15 g/l + 5 g/l); 3- Glukoza + otpadni glicerol SU (15 g/l + 5 g/l); 4- Glukoza + otpadni glicerol RU (15 g/l + 5 g/l)

Tabela 7.2 Promena koncentracije glukoze tokom fermentacije pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A u podlozi MRS sa glukozom, kao i MRS sa glukozom i čistim glicerolom i glicerolom SU i RU

GLUKOZA													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1	19,47	17,98	15,33	13,39	12,46	11,95	11,22	10,54	9,68	8,90	8,11	7,57	7,56
2	14,52	12,24	11,34	10,56	9,62	8,79	8,12	7,79	7,23	6,84	6,58	6,57	6,54
3	15,83	15,46	14,93	14,08	12,95	12,14	11,31	10,56	9,76	8,87	7,04	6,90	6,81
4	15,39	15,10	14,24	13,64	13,01	12,43	11,57	10,89	10,14	9,78	9,03	8,64	8,31

1- Glukoza (20 g/l); 2- Glukoza + čist glicerol (15 g/l + 5 g/l); 3- Glukoza + otpadni glicerol SU (15 g/l + 5 g/l); 4- Glukoza + otpadni glicerol RU (15 g/l + 5 g/l)

Tabela 7.3 Promena koncentracije glicerola tokom fermentacije pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A u podlozi MRS sa glukozom, kao i MRS sa glukozom i čistim glicerolom i glicerolom SU i RU

GLICEROL (mg/ml)													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5,32	4,97	4,66	4,31	4,12	3,87	3,78	3,67	3,59	3,50	3,44	3,45	3,45
3	4,74	4,63	4,45	4,28	4,05	3,86	3,71	3,55	3,40	3,33	3,27	3,26	3,24
4	4,45	4,41	4,36	4,28	4,03	3,82	3,75	3,69	3,53	3,24	3,26	3,26	3,25

1- Glukoza (20 g/l); 2- Glukoza + čist glicerol (15 g/l + 5 g/l); 3- Glukoza +otpadni glicerol SU (15 g/l + 5 g/l); 4- Glukoza + otpadni glicerol RU (15 g/l + 5 g/l)

Tabela 7.4 Promena koncentracije mlečne kiseline tokom fermentacije pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A u podlozi MRS sa glukozom, kao i MRS sa glukozom i čistim glicerolom i glicerolom SU i RU

MLEČNA KISELINA (mg/ml)													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1	1,41	2,23	3,54	6,78	9,56	11,14	12,48	13,88	14,92	15,76	16,02	15,98	16,01
2	1,16	1,64	2,26	3,87	5,14	6,93	9,17	11,24	12,88	14,21	14,88	15,06	15,11
3	1,52	1,89	2,32	3,91	5,12	7,24	9,18	10,46	11,60	12,84	14,38	14,61	14,78
4	1,38	1,52	1,91	2,94	4,16	5,22	6,31	7,56	8,86	10,04	10,98	11,57	11,83

1- Glukoza (20 g/l); 2- Glukoza + čist glicerol (15 g/l + 5 g/l); 3- Glukoza +otpadni glicerol SU (15 g/l + 5 g/l); 4- Glukoza + otpadni glicerol RU (15 g/l + 5 g/l)

Tabela 7.5 Promena optičke gustine (biomase) bakterije *E. faecalis* MK3-10A tokom fermentacije u podlozi MRS sa čistim glicerolom, otpadnim glicerolom SU i RU

OD 620													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1'	0,056	0,111	0,256	0,327	0,457	0,513	0,599	0,624	0,678	0,631	0,587	0,574	0,562
2'	0,048	0,098	0,123	0,189	0,227	0,309	0,412	0,523	0,607	0,664	0,690	0,682	0,686
3'	0,071	0,093	0,114	0,148	0,178	0,224	0,283	0,301	0,324	0,371	0,441	0,464	0,467

1'- Čist glicerol (15 g/l); 2'- Otpadni glicerol SU (15 g/l); 3'- Otpadni glicerol RU (15 g/l)

Tabela 7.6 Promena koncentracije glicerola tokom fermentacije pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A u podlozi MRS sa čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

GLICEROL (mg/ml)													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1'	20,14	19,66	18,82	17,69	16,54	15,87	15,16	14,68	14,24	13,73	13,56	13,40	13,29
2'	18,67	18,46	17,94	17,33	16,58	15,74	14,87	12,91	12,43	12,12	11,98	11,94	11,76
3'	16,79	16,71	16,65	16,04	15,67	15,14	14,88	14,12	13,77	13,41	13,34	13,29	13,26

1'- Čist glicerol (15 g/l); 2'- Otpadni glicerol SU (15 g/l); 3'- Otpadni glicerol RU (15 g/l)

Tabela 7.7 Promena koncentracije mlečne kiseline tokom fermentacije pomoću bakterije *E. faecalis* MK3-10A u podlozi MRS sa čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

MLEČNA KISELINA (mg/ml)													
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1'	1,21	1,77	3,65	5,21	7,25	9,47	10,24	11,84	13,04	13,75	14,22	14,64	14,65
2'	1,14	2,03	3,35	4,67	6,48	8,20	9,33	10,45	12,05	14,16	15,25	15,74	15,78
3'	1,18	1,24	1,41	1,87	2,46	3,67	4,34	6,22	7,18	7,98	8,74	9,15	9,34

1'- Čist glicerol (15 g/l); 2'- Otpadni glicerol SU (15 g/l); 3'- Otpadni glicerol RU (15 g/l)

Tabela 7.8 Promena koncentracije suve biomase bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 tokom fermentacije osnovnoj podlozi sa glukozom, čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

SUVA BIOMASA (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
<b>1</b>	0,46	3,09	7,54	10,18	8,42	5,96	7,9	5,8
<b>2</b>	0,55	6,14	9,04	8,85	8,59	7,15	6,81	4,92
<b>3</b>	0,51	6,41	8,88	8,02	6,64	5,3	4,1	3,35
<b>4</b>	0,37	0,96	2,24	4,18	6,52	3,23	2,89	2,65

1- Glukoza; 2- Čist glicerol; 3- Glicerol SU; 4- Glicerol RU

Tabela 7.9 Promena koncentracije izvora ugljenika tokom fermentacije u osnovnoj podlozi sa glukozom, čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

Izvor ugljenika (glukoza-glicerol) (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
<b>1</b>	15,55	11,40	7,57	4,34	2,17	1,56	0,56	0,31
<b>2</b>	14,57	12,35	11,02	9,94	9,23	8,67	8,24	7,72
<b>3</b>	13,97	12,46	11,82	10,24	8,77	8,43	8,21	8,10
<b>4</b>	14,16	13,25	12,64	12,12	11,38	10,54	9,87	9,06

1- Glukoza; 2- Čist glicerol; 3- Glicerol SU; 4- Glicerol RU



Tabela 7.10 Promena koncentracije antibiotika heksaena H-85 tokom fermentacije u osnovnoj podlozi sa glukozom, čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

<b>Heksaen H-85 (µg/ml)</b>								
<b>vreme(h) /Izvor ugljenika</b>	0	24	48	72	96	120	144	168
<b>1</b>	1,4	48	91	122	146	116	89	27
<b>2</b>	2,2	24	67	106	121	95	43	16
<b>3</b>	2,4	63	121	162	116	83	140	41
<b>4</b>	1,8	31	75	94	64	42	22	12

1- Glukoza; 2- Čist glicerol; 3- Glicerol SU; 4- Glicerol RU

Tabela 7.11 Promena koncentracije antibiotika azalomicina B tokom fermentacije u osnovnoj podlozi sa glukozom, čistim glicerolom i otpadnim glicerolom SU i RU

<b>Azalomicin B (µg/ml)</b>								
<b>vreme(h) /Izvor ugljenika</b>	0	24	48	72	96	120	144	168
<b>1</b>	0,4	19,7	31,4	38,7	29,3	18,1	4,3	0,9
<b>2</b>	0,9	16,3	21,7	29,4	33,1	20,2	13,3	2,4
<b>3</b>	0,2	7,3	11,0	8,4	6,2	4,8	3,1	1,2
<b>4</b>	0,4	2,5	12,6	19,6	24,4	14,7	1,1	0,3

1- Glukoza; 2- Čist glicerol; 3- Glicerol SU; 4- Glicerol RU

Tabela 7.12 Promena koncentracije suve biomase tokom fermentacije čistog glicerola pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom

SUVA BIOMASA (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	0,6	5,8	9,3	8,7	7,5	5,1	3,4	2,8
2*	1,1	3,4	6,2	8,8	6,3	5,4	2,7	2,1
3*	0,4	3,5	5,1	8,0	4,8	3,9	2,5	2,3
4*	1,3	2,8	5,7	8,1	6,4	5,9	4,5	1,8
5*	0,5	7,3	9,5	6,9	5,5	4,9	4,1	3,7
6*	0,5	4,6	7,8	8,2	7,1	6,3	5,4	2,8
7*	1,2	2,1	3,8	6,8	4,2	2,7	1,8	1,3

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.13 Promena koncentracije suve biomase tokom fermentacije glicerola SU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazonom

SUVA BIOMASA (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	0,7	5,4	8,7	8,2	6,8	4,4	2,7	2,2
2*	0,6	2,1	6,6	8,4	6,4	5,0	3,3	1,5
3*	1,1	4,1	5,8	7,5	8,2	5,2	4,5	1,7
4*	0,7	1,9	3,3	5,1	5,9	5,3	3,6	2,1
5*	1,2	5,2	7,4	9,7	8,2	5,7	3,7	2,4
6*	0,6	4,3	6,9	7,6	6,5	4,9	2,2	0,9
7*	0,8	1,7	2,9	4,6	5,4	3,9	3,1	1,4

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.14 Promena koncentracije suve biomase tokom fermentacije glicerola RU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazonom

SUVA BIOMASA (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	1,1	4,4	6,1	6,9	6,2	5,5	4,7	4,2
2*	0,4	3,8	5,2	6,3	7,1	5,8	5,1	3,1
3*	0,5	1,2	2,0	3,7	5,8	4,0	3,6	3,3
4*	0,9	1,9	3,9	6,1	5,3	4,2	3,4	2,8
5*	0,4	3,1	4,6	6,5	6,2	5,8	4,0	3,6
6*	0,7	2,6	3,8	4,7	5,9	3,6	2,7	2,4
7*	0,6	1,5	3,1	4,4	5,5	4,8	4,1	3,2

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.15 Promena koncentracije glicerola tokom fermentacije čistog glicerola pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom

Glicerol (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	14,8	13,5	12,1	11,0	10,3	9,7	8,9	8,6
2*	15,5	12,8	10,9	10,4	9,9	9,6	9,2	9,1
3*	15,2	14,7	14,1	13,6	13,3	12,9	12,3	11,8
4*	15,8	15,1	13,6	12,3	12,1	11,9	11,4	10,9
5*	14,4	13,1	11,8	10,4	9,5	8,8	8,1	7,6
6*	15,4	14,2	13,6	12,8	11,5	10,8	9,7	9,1
7*	14,6	14,1	13,4	12,8	12,2	11,5	10,9	10,4

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.16 Promena koncentracije glicerola tokom fermentacije glicerola SU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom

Glicerol (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	14,5	13,2	11,8	10,9	10,5	10,1	9,6	9,3
2*	14,2	13,8	12,1	11,5	10,9	10,4	9,9	9,5
3*	15,3	15,1	14,9	14,4	13,3	12,9	12,6	12,5
4*	14,1	13,7	13,1	11,9	11,3	10,6	10,2	10,0
5*	13,8	13,1	12,6	11,9	11,1	10,6	9,5	8,8
6*	14,4	12,9	11,8	11,2	10,9	10,5	10,2	9,9
7*	13,9	13,7	13,3	12,6	12,1	11,7	11,2	10,8

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.17 Promena koncentracije glicerola tokom fermentacije glicerola RU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom

Glicerol (g/l)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	14.2	13.8	13.3	12.2	11.4	11.1	10.7	10.4
2*	14.5	14.1	13.9	13.6	11.2	10.8	10.5	10.3
3*	13.8	13.3	12.9	12.4	11.9	11.6	11.4	11.4
4*	14.5	13.9	13.1	12.4	12.1	11.9	11.8	11.6
5*	13.7	13.4	12.9	12.1	11.4	11.2	10.9	10.5
6*	13.6	13.4	13	12.6	11.9	11.6	11.5	11.3
7*	13.8	13.7	13.5	13.3	12.3	12.1	11.8	11.6

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.18 Promena koncentracije heksaena H-85 tokom fermentacije čistog glicerola pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom

		Heksaen H-85 (µg/ml)						
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	0,7	84	126	149	130	76	41	33
2*	1,1	91	135	179	194	158	108	37
3*	1,1	88	109	156	166	107	42	28
4*	0,4	102	138	161	154	111	39	22
5*	1,2	79	116	138	182	154	120	41
6*	0,4	45	87	119	138	93	47	16
7*	0,9	11	64	109	128	145	86	47

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.19 Promena koncentracije heksaena H-85 tokom fermentacije otpadnog glicerola SU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom

Heksaen H-85 (µg/ml)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	1,2	81	127	151	130	88	48	14
2*	1,4	65	94	129	186	141	111	21
3*	3,3	38	79	112	161	96	56	15
4*	0,9	22	61	89	116	134	93	11
5*	2,2	51	98	136	196	119	43	28
6*	2,2	33	57	80	135	61	38	27
7*	1,5	4,6	27	78	103	128	59	4

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.20 Promena koncentracije heksaena H-85 tokom fermentacije otpadnog glicerola iz proizvodnje biodizela od repičinog ulja pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom

Heksaen H-85 (µg/ml)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	0,8	3,2	55	112	141	97	44	16
2*	1,2	11	42	85	133	122	79	21
3*	0,7	25	49	80	113	137	27	8
4*	2,1	7,3	33	57	75	122	31	14
5*	1,6	21	47	94	153	130	76	17
6*	1,7	5,2	22	65	98	118	74	23
7*	2,4	6,5	19	34	69	97	55	24

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)



Tabela 7.21 Promena koncentracije azalomicina B tokom fermentacije čistog glicerola pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazonom

Azalomicin B (µg/ml)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	1,1	19	24	33	38	29	20	11
2*	0,3	27	36	41	53	46	28	14
3*	0,7	22	29	47	34	26	18	12
4*	0,8	31	42	51	64	51	32	24
5*	0,3	6	4	9	18	59	10	3
6*	0,3	24	20	27	52	19	11	10
7*	0,5	15	27	36	41	42	33	18

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4'-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.22 Promena koncentracije azalomicina B tokom fermentacije otpadnog glicerola SU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazonom

Azalomicin B (µg/ml)								
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168
1*	0,4	8	19	24	32	21	10	7
2*	0,7	5	13	21	27	18	15	9
3*	1,2	2	9	19	42	24	15	12
4*	0,8	11	6	27	35	46	17	16
5*	0,4	16	36	31	39	49	33	6
6*	0,9	12	24	30	35	22	13	12
7*	0,8	3	12	7	31	38	21	10

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.23 Promena koncentracije azalomicina B tokom fermentacije otpadnog glicerola RU pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7u podlogama sa triptofanom, 5-hloroizatin-3-hidrazonom, 5-hloroizatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-tozilhidrazonom, izatin-3-hidrazonom, izatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazonom i 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazonom

		Azalomicin B (µg/ml)							
vreme(h) /Izvor ugljenika	0	24	48	72	96	120	144	168	
1*	0,3	1,2	4,6	22	30	37	15	6	
2*	0,6	8	12	16	40	18	12	8	
3*	0,2	26	48	57	64	69	55	11	
4*	0,2	13	35	41	50	71	53	4	
5*	0,5	22	14	61	75	66	49	12	
6*	1,1	6	19	26	33	21	10	4	
7*	0,2	3	29	18	41	50	34	7	

1\*- Triptofan (15 g/dm<sup>3</sup>); 2\*- 5-hloroizatin-3-hidrazon + triptofan (10 g/dm<sup>3</sup>+5 g/dm<sup>3</sup>); 3\*- 5-hloroizatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 4\*- Izatin-3-tozilhidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 5\*- Izatin-3-hidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 6\*- Izatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>); 7\*- 5-hloroizatin-3-(4`-hidroksi)benzoihidrazon + triptofan (10g/dm<sup>3</sup>+5g/dm<sup>3</sup>)

Tabela 7.24 Promena optičke gustine tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa čistim glicerolom

		OD <sub>620</sub>										
vreme (dan) /Izolat	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	
1	0,052	0,061	0,188	0,379	0,456	0,772	0,899	1,156	1,202	1,480	1,456	
2	0,049	0,288	0,362	0,551	0,635	0,732	1,106	1,249	1,310	1,387	1,612	
3	0,046	0,132	0,171	0,375	0,592	0,727	0,882	1,168	1,305	1,496	1,560	
4	0,057	0,133	0,179	0,371	0,489	0,611	0,834	1,206	1,287	1,324	1,310	

1- *Chlorella* sp.; 2- *Chlorococcum* sp.; 3- *Desmodesmus* sp.; 4- *Scenedesmus* sp.

Tabela 7.25 Promena optičke gustine tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa otpadnim glicerolom SU

		Glicerol (mg/ml)										
vreme (dan)		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
/Izolat												
1		13,75	13,21	12,18	11,31	9,41	8,72	8,18	7,68	7,25	6,91	6,78
2		13,77	13,64	12,98	11,03	9,65	6,31	4,02	1,14	0,20	0,00	0,00
3		13,35	13,17	12,94	11,67	10,86	9,72	9,14	8,45	7,88	7,03	6,55
4		13,96	13,88	13,75	12,54	11,36	8,96	8,27	7,13	6,51	6,02	5,65

1- *Chlorella* sp.; 2- *Chlorococcum* sp.; 3- *Desmodesmus* sp.; 4- *Scenedesmus* sp.

Tabela 7.26 Promena optičke gustine tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa otpadnim glicerolom RU

		OD <sub>620</sub>										
vreme (dan)		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
/Izolat												
1		0,047	0,023	0,019	0,168	0,338	0,434	0,790	0,891	0,964	1,108	1,302
2		0,051	0,257	0,323	0,492	0,587	0,640	0,838	0,951	1,102	1,184	1,360
3		0,042	0,118	0,153	0,335	0,463	0,781	0,885	1,114	1,231	1,254	1,290
4		0,055	0,119	0,160	0,298	0,381	0,519	0,683	1,056	1,133	1,142	1,136

1- *Chlorella* sp.; 2- *Chlorococcum* sp.; 3- *Desmodesmus* sp.; 4- *Scenedesmus* sp.

Tabela 7.27 Poromena koncentracije glicerola tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa čistim glicerolom

		Glicerol (mg/ml)										
vreme (dan)		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
	/Izolot											
1		13,46	13,21	12,69	12,33	11,87	11,14	10,53	9,47	8,94	8,51	8,34
2		13,14	13,11	12,26	10,06	7,88	5,12	2,46	1,16	0,24	0,09	0,00
3		14,06	13,95	13,34	11,84	11,14	10,43	9,83	9,12	8,61	8,40	8,29
4		13,17	12,35	11,43	10,16	8,24	7,56	7,32	7,16	7,05	7,02	6,98

1- *Chlorella sp.*; 2- *Chlorococcum sp.*; 3- *Desmodesmus sp.*; 4- *Scenedesmus sp.*

Tabela 7.28 Poromena koncentracije glicerola tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa otpadnim glicerolom SU

		OD <sub>620</sub>										
vreme (dan)		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
	/Izolot											
1		0,051	0,094	0,128	0,314	0,476	0,623	0,837	0,958	0,991	0,981	0,988
2		0,056	0,168	0,330	0,545	0,671	0,808	0,923	1,011	1,164	1,222	1,280
3		0,043	0,103	0,164	0,212	0,331	0,486	0,620	0,835	0,984	1,101	1,114
4		0,052	0,228	0,369	0,462	0,523	0,604	0,686	0,807	0,951	0,994	1,187

1- *Chlorella sp.*; 2- *Chlorococcum sp.*; 3- *Desmodesmus sp.*; 4- *Scenedesmus sp.*

Tabela 7.29 Promena koncentracije glicerola tokom gajenja izolovanih slatkovodnih jednoćelijskih algi iz rodova *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus* u BBM podlozi sa otpadnim glicerolom RU

		Glicerol (mg/ml)										
vreme (dan)		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
	/Izolot											
1		13,16	13,08	13,02	12,61	11,97	11,04	9,66	9,35	8,30	7,72	7,37
2		13,24	13,08	12,76	12,12	11,46	9,56	7,31	6,07	5,71	5,54	5,16
3		12,92	12,75	12,23	11,75	11,21	10,76	10,04	9,37	8,78	8,21	7,50
4		13,21	12,86	12,55	11,93	11,22	10,54	10,03	9,64	9,15	9,06	8,98

1- *Chlorella sp.*; 2- *Chlorococcum sp.*; 3- *Desmodesmus sp.*; 4- *Scenedesmus sp.*

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jovan Ćirić je rođen 06.02.1985. godine u Prokuplju. Živi u Nišu, u braku je i otac je dve kćeri. Srednju prehrambeno-hemijsku školu, smer prehrambeni tehničar, završio je u Nišu 2004. godine kao đak generacije. Tehnološki fakultet u Leskovcu, smer Prehrambeno inženjerstvo, završio je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,23.

U srednjoj školi i za vreme studija bio je korisnik stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Dobitnik je specijalnog priznanja za izuzetne rezultate postignute na osnovnim studijama koje dodeljuje Srpsko hemijsko društvo.

Doktorske studije na istom fakultetu, studijski program – Tehnološko inženjerstvo, upisao je 2009. godine. Odslušao je i položio sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10,00.

Od februara 2011. angažovan je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: „Nanostrukturni funkcijalni i kompozitni materijali u katalitičkim i sorpcionim procesima” (III 45001). Angažovan je i kao saradnik u izvođenju vežbi na predmetima osnovnih akademskih studija studijskog programa Prehrambena tehnologija i biotehnologija.

Objavljeni radovi:

Rad u međunarodnom časopisu (M<sub>23</sub>)

1. Danilović B., Avramović J., Ćirić J., Savić D., Veljković V., Production of biodiesel from microalgae, Chem. Ind. 68 (2) (2014) 213-232.
2. Ćirić J., Konstantinović S., Ilić S., Gojgić-Cvijović G., Savić D., Veljković V., The impact of isatin derivatives on antibiotic production by *Streptomyces hygrosopicus* CH-7, Chem. Ind. 70 (2) (2016) 123-128.
3. Konstantinović S., Danilović B., Ćirić J., Ilić S., Savić D., Veljković V., Valorization of crude glicerol from biodiesel production, Chem. Ind. Chem. Eng. Q., 22(4) (2016) 461-489.

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja, štampan u izvodu (M<sub>34</sub>)

4. Ćirić J., Joković N., Ilić S., Konstantinović S., Veljković V., Gojgić-Cvijanović G., Savić D., Growth and antibiotic production by *Streptomyces hygrosopicus* on glicerol obtained from biodiesel production, Microbiologia Balkanica, 7th Balkan Congress Of Microbiology, Proceedings on CD, 25-29.10. 2011., Belgrade, Serbia.
5. Konstantinović S., Ilić S., Ćirić J., Savić D., Gojgić-Cvijović G., Veljković V., Influence of nitrogen sources on the antibiotic production by *Streptomyces hygrosopicus*, International Scientific Conference „10th Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of Abstracts, 66, 14.-16.11. 2013. Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, ISBN 978-99938-54-48-7.
6. Ćirić J., Danilović B., Savić D., Veljković V., Comparison of various oil extraction methods from freshwater filamentous green algae, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries ICOSEC, Book of Abstracts, 189, 27.-29.06.2013. Beograd, Srbija, ISBN 978-86-7132-053-5.

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M<sub>52</sub>)

7. Ćirić J., Ilić S., Konstantinović S., Veljković V., Gojgić-Cvijović G., Savić D., Fermentacija glicerola pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, *Advanced technologies* 1(2) (2012) 20-25.

8. Ilić S., Konstantinović S., Ćirić J., Savić D., Gojgić-Cvijović G., Veljković V., Crude glicerol and whey as carbon and nitrogen sources for the production of antibiotics, *Advanced technologies*, 5(1) (2016) 5-9.

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja sa međunarodnim učešćem, štampan u izvodu (M<sub>64</sub>)

9. Ćirić J., Ilić S., Konstantinović S., Veljković V., Gojgić-Cvijović G., Savić D., Glicerol as a carbon source for antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, BFP-34, p.121, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Sept. 05 – 09 2012, Ohrid, Macedonia.

10. Savić D., Ćirić J., Danilović B., Veljković, V., Growth kinetics of lipid producing freshwater microalgae isolates, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia with international participant, Book of abstract, BFP-36, p.123, September 5.-9. 2012, Ohrid, Macedonia.

11. Konstantinović S., Ilić S., Ćirić J., Savić D., Veljković V., Gojgić-Cvijović G., Uticaj Schiff-ovih baza na produkciju antibiotika pomoću bakterije *Streptomyces hygroscopicus*, 10-ti simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Zbornik izvoda radova OHT-9, str.107, 22-23.10.2013. Leskovac, Srbija, ISBN 978-86-82367-98-7.

12. Konstantinović S., Ilić S., Ćirić J., Savić D., Veljković V., Gojgić-Cvijović G., Uticaj derivata 5-hlorizatina na produkciju antibiotika pomoću *Streptomyces hygroscopicus*, 10-ti simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Zbornik izvoda radova OHT-10, str.108, 22-23.10.2013. Leskovac, Srbija, ISBN 978-86-82367-98-7.



13. Ćirić J., Danilović B., Simeunović J., Veljković V., Savić D., Izolacija slatkovodnih mikroalgi za dobijanje ulja kao sirovine za proizvodnju biodizela, IX Kongres mikrobiologa Srbije, Mikromed, Knjiga Apstrakata, 30.05-01.06.2013. Beograd, Srbija, ISBN 978-86-914897-1-7.

14. Konstantinović S., Ilić S., Ćirić J., Zlatković M., Savić D., Veljković V., Gojgić-Cvijović G., Uticaj kompleksa izatin-3-tiosemikarbazona na produkciju antibiotika pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, 11-ti simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Zbornik izvoda radova BPT-43, str.81, 23-24.10.2015. Leskovac, Srbija.

15. Ilić S., Konstantinović S., Ćirić J., Jovanović M., Savić D., Veljković V., Gojgić-Cvijović G., Optimizacija fermentacionih uslova za produkciju antibiotika pomoću *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, 11-ti simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Zbornik izvoda radova BPT-44, str.82, 23-24.10.2015. Leskovac, Srbija.