

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Aneta V. Buntić

**PRIMENA AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA ZA
IZDVAJANJE KATJONSKIH BOJA I BIOLOŠKIH
MOLEKULA IZ VODENOG RASTVORA PROCESOM
BIOSORPCIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Aneta V. Buntić

**APPLICATION OF THE AGROINDUSTRIAL BY-
PRODUCTS FOR REMOVAL OF CATIONIC DYES AND
BIOLOGICAL MOLECULES FROM WATER SOLUTION
BY BIOSORPTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTOR:

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Dušan Antonović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Jovan Nedeljković, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklerne nauke „Vinča”

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost u izradi ove disertacije dugujem svom divnom mentoru, profesorki dr Suzani Dimitrijević-Branković, uz čiju sam nesebičnu pomoć, bezgraničnu podršku, velikom strpljenju i pažljivim usmeravanjem tokom rada uspela da prevaziđem sve prepreke na koje sam nailazila, što je za mene od neprocenjivog značaja.

Podjednako se zahvaljujem profesorki dr Slavici Šiler-Marinković koja je nesebično uložila svoje znanje, iskustvo i vreme u svim fazama rada. Bez njenih dragocenih stručnih saveta rad na ovoj tezi ne bi bio tako prijatno iskustvo.

Veliko hvala profesorima dr Dušanu Antonoviću i dr Jovanu Nedeljkoviću na diskusijama i korisnim sugestijama koji su doprineli kvalitetnijem istraživanju i oblikovanju ovog rada. Bilo je zadovoljstvo sarađivati sa njima.

Neizmernu zahvalnost dugujem i prijateljima i kolegama sa katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, a posebno jedno veliko hvala dugujem svojoj najdražoj koleginici Mariji Pavlović na beskrajnoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije. Bila je uvek tu za mene da podelimo i dobre i loše trenutke prilikom izrade ove disertacije. Hvala joj od srca!

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koji su finansirali moj rad na doktorskoj tezi.

Posebno se zahvaljujem svojoj porodici, sestri Arijani i tati Vilku za sve godine mog školovanja, beskrajnoj ljubav, razumevanju i veru da cu istrajati u svojim zamislima. Njima u čast, i mojoj mami Zlatici koja vise nije sa nama, od srca je posvećena ova doktorska disertacija.

Najlepše vam hvala!

Primena agroindustrijskog otpada za izdvajanje katjonskih boja i bioloških molekula iz vodenog rastvora procesom biosorpcije

Rezime

Predmet ove doktorske disertacije je valorizacija nus-proizvoda agroindustrije: otpadnih rezanaca iz prerade šećerne repe i otpadne kafe, odnosno taloga, koji ostaje nakon pripreme napitaka u ugostiteljskim objektima.

Ostaci nakon obrade šećerne repe i ostaci od kafe predstavljaju agroindustrijski nus-proizvod okarakterisan kao visoko specifični obnovljivi otpad, koji je obično dostupan u velikim količinama. Najčešće predstavljaju sirovine koje se razmatraju i proučavaju za razvoj jeftinih adsorbenata kako bi zamenili skup komercijalni aktivni ugalj u njegovoj primeni, o čemu svedoče brojni dokazi u literaturi. Mogu se koristiti u nativnom stanju uz mehaničku obradu ili se vrši njihova obrada termičkim ili hemijskim putem, a u novije vreme, i primenom mikrotalasa. Repini rezanci kao adsorbent mogu naći primenu u brojnim procesima, pre svega u prečišćavanju otpadnih voda, posebno onih nastalih u tekstilnoj industriji ili drugim industrijama korisnicima boja. Zbog teškog predviđanja njihove prosečne koncentracije i teške razgradivosti, boje su jedan od zagađivača koji se najteže uklanja iz otpadnih voda. Ne postoji jedinstven i adekvatan proces sposoban da izvrši kompletnu obradu obojenih otpadnih voda u današnje vreme. U vezi sa tim, u praksi se daje prednost primeni integrisanih procesa za njihov tretman.

Otpadna kafa može biti iskorišćena u procesima ekstrakcije zaostalih biološki aktivnih polifenola (kao antioksidansi) kao i u procesima adsorpcije različitih tipova zagađivača. Pored toga, otvaraju se i nove mogućnosti primene otpadne kafe kao adsorbenata za imobilizaciju različitih bioloških molekula, kao što su enzimi. S obzirom na hemijski sastav otpadne kafe, u kojoj je pretežno zastupljena hemiceluloza i celuloza, enzimi za koje bi kafa bila potencijalno pogodan nosač su iz grupe celulaza.

U skladu sa prethodno zabeleženim, postavljena su dva cilja ove disertacije. Prvi je da se otpadni repini rezanci iskoriste kao alternativni adsorbent za uklanjanje boje kristal violet iz otpadnih voda, kao i potpuna obrada otpadne vode primenom integrisanih procesa adsorpcije i biorazgradnje. Kao drugi cilj, postavljena je primena otpadne kafe kao nosača

za adsorpciju enzima celulaze. U vezi s tim, istraživanja u ovom radu podeljena su na tri dela.

U prvom delu su repini rezanci, u nativnom i aktiviranom obliku pomoću mikrotalasa, korišćeni kao adsorbenti. Određene su površinske karakteristike adsorbenata i razmatran je predlog njihove primene za potrebe adsorpcije boje kristal violet iz otpadnih voda. Definisani su kapaciteti vezivanja boje, tok reakcija i postizanje ravnoteže, a zatim i adsorpciona kinetika i izoterme. Za određivanje odgovarajućih kinetičkih i ravnotežnih parametara ispitivano je slaganje eksperimentalnih rezultata sa najpoznatijim teorijskim modelima. Upoređena je efikasnost primene aktiviranih repinih rezanaca u odnosu na adsorbent neorganskog porekla, kao što je prirodan zeolit. Za optimizaciju uslova adsorpcije boje na repine rezance i zeolit, korišćena je statistička metoda odzivne površine, primenom *Design Expert* softvera.

U drugom delu za potrebe kompletne obrade otpadne vode, nakon adsorpcije boje, uključen je još jedan postupak obrade, proces biorazgradnje. U procesu biorazgradnje, korišćene su vrste iz roda *Streptomyces* sp, gde je ispitan njihov potencijal biorazgradnje molekula boje kristal violet u cilju njegove konačne mineralizacije. Utvrđeni su uslovi maksimalne biorazgradnje ovog zagađivača, kao i fitotoksičnost nastalih razgradnih proizvoda. Efikasnost procesa je izražena preko procenta uklanjanja boje iz vodenog rastvora, dok je za potrebe pretpostavke mehanizma biorazgradnje, urađena i kvantifikacija enzimске aktivnosti.

U trećem delu otpadna kafa je iskorišćena kao nosač za izdvajanje bioloških molekula - enzima celulaze (komercijalno dostupne iz *Trichoderma reesei* i celulaze iz prirodnog izolata *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1). Urađena je modifikacija nosača korišćenjem jakih oksidacionih sredstava, i to: glutraldehida, hlor-dioksida i vodonik-peroksida. Određen je sastav površinskih funkcionalnih grupa i analiziran morfološki izgled površina nosača od otpadne kafe. Definisani su prinos i efikasnost imobilizacije enzima na kafi i njegova stabilnost, kao i kinetičke konstante procesa adsorpcije.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, pronađeno je da se kombinovanje procesa adsorpcije i biorazgradnje može smatrati pogodnim izborom u prečišćavanju obojenih otpadnih voda. Pri optimalnim uslovima

adsorpcije boje kristal violet na aktivirane repine rezance postignut je adsorpcioni kapacitet 28,863 mg/g, dok je maksimalna količina uklonjene boje iz rastvora od 97,923 % postignuta neaktiviranim repinim rezancima. Utvrđeni optimalni uslovi za maksimalnu biorazgradnju boje vrstom *Streptomyces microflavus* CKS6 su: temperatura od 30 °C, pH rastvora boje 6 i dinamika mešanja reakcionih smeša od 120 rpm. Potpuna biorazgradnja boje kristal violet koncentracije 0,010 g/l ostvarena je nakon 12 h. Obradena otpadna voda je potpuno bezbedna i netoksična po životnu sredinu.

Sledeći predlog je da se otpadna kafa modifikovana predloženim oksidativnim sredstvima, može primeniti za imobilizaciju celulaza. Najefikasniji nosač je postignut primenom hlor-dioksida, a optimalni uslovi pripreme su: trajanje procesa modifikacije 30 min, 25 % rastvor hlor-dioksida i odnos aktivator/nosač 6 ml/mg. Postignuti maksimalni prinos i efikasnost imobilizacije celulaze poreklom iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, su redom, od oko 71 % i oko 73 %.

Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u mogućnosti razvoja postupka prečišćavanja otpadnih voda industrija korisnika boja. Njihova kompletna obrada primenom integrisanih procesa adsorpcije, kroz praktičnu primenu otpadnih repinih rezanaca kao alternativnih jeftinih adsorbenata, u kombinaciji sa procesom biorazgradnje toksične katjonske boje vrstama roda *Streptomyces* sp.

Drugi naučni doprinos je u praktičnoj primeni otpadne kafe kao nosača za biološke molekule (enzime iz grupe celulaza) za njihovo direktno izdvajanje i prečišćavanje iz složenih medijuma u kojima su produkovani u cilju njihove dalje profitabilne primene u industrijskom sektoru.

Ključne reči: otpadni repini rezanci, otpadna kafa, zeolit, kristal violet, adsorpcija, kinetika, izoterme, biorazgradnja, *Streptomyces*, safranin T, celulaze, imobilizacija.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Inženjerstvo zaštita životne sredine

UDK: 628.477:667.283.4:57.088:544.723.2

Application of the agro-industrial by-products for removal of cationic dyes and biological molecules from water solution by biosorption

Abstract

The subject of this doctoral dissertation is the valorization of the by-products of agro-industry: sugar beet pulp waste, which remains after sugar processing, and spent coffee waste, which remains after preparing coffee in the industrial conditions.

The sugar beet pulp and coffee residues represent the by-products which are classified as highly specific and renewable waste of the agro-industry, and they are usually available in large quantities. They represent the most common raw materials which are considered and studied for the development of low-cost adsorbents to replace expensive commercial activated carbon in its application, which are explained by a lot of evidence in literature. They can be used in a native state only with the mechanical treatment or by using thermal or chemical treatment, but in recent times, and with the application of microwaves. Sugar beet pulp as adsorbent can find application in numerous processes, primarily in the wastewater purification, particularly from the textile industry or other industries which use dye. Because of the difficult estimate of their average concentration in wastewater and a weak degradation, dyes are one of the pollutants that are the hardest to remove from the wastewater. There is not a unique and an adequate process with ability to perform the complete wastewater purification at the moment. Related to this, in practice preference is given to application of the treatment with integrated processes.

Spent coffee residues can be used for the extraction of residual biological active polyphenols (as antioxidants), as well as for the adsorption processes of different types of pollutants. In addition, new possibilities are opening of application of coffee waste as an adsorbent for the immobilization of various biological molecules such as enzymes. Due to the chemical composition of the coffee waste, in which the most dominate hemicellulose and cellulose, the coffee carrier should be a potentially suitable for the immobilization of the enzymes from the group of cellulases.

In accordance with the previously noted, there are two objectives of this dissertation. The first is that the sugar beet pulp utilization as a low-cost adsorbent for

removal of the crystal violet dye from wastewater, as well as the complete treatment of wastewater by integrated processes of adsorption and biodegradation. The second objective is the application of the spent coffee residues as a carrier for the adsorption of cellulase enzymes. In accordance with this, the research is divided into three sections.

In the first part, the sugar beet pulp, in a native form and in an activated form by using microwaves, used as adsorbents. The surface properties of the adsorbents were determined, and the proposal of their application for the adsorption of the crystal violet dye from wastewater, was considered. The adsorption capacities, the courses of the adsorption process, the achieving equilibrium, the adsorption kinetics and isotherms were defined. For determination of the appropriate kinetic and equilibrium parameters, the fitting between the experimental results with the theoretical models, was examined. The efficiency of the activated sugar beet pulp adsorbent as compared to the adsorbent of the inorganic origin, such as natural zeolite, was compared. For the optimization of the adsorption process of dye onto sugar beet pulp and zeolite adsorbents, the statistical method of the response surface methodology was utilized by application of the Design Expert softer.

In the second part, for the needs of complete treatment of the wastewater, after the dye adsorption process, another process, the biodegradation process was involved into the treatment. In the process of biodegradation, strains from genus *Streptomyces* were used. Their biodegradation potential to degrade the crystal violet dye molecules in order for their mineralization was investigated. The conditions of the maximal biodegradation of the pollutant were determined, as well as the phytotoxicity of products after the biodegradation. The efficiency of the process was expressed by the percent of removal of the dye from the working aqueous solutions. For the purposes of the assumptions of the potential mechanism of the biodegradation, the quantification of enzyme activities, were made.

In the third part, the spent coffee residues were utilized as a carrier for the immobilization of the biological molecules - the enzymes cellulase (available as commercial enzyme from *Trichoderma reesei*, and cellulase from natural isolates *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1). The carrier modification using the strong oxidizing agents such as gluteraldehyde, chlorine dioxide and hydrogen peroxide, were made. The

composition of the surface functional groups and the morphological structure of the surface of the carrier from the coffee residues, were determined and analyzed. The immobilization yield and the immobilization efficiency of the enzyme onto the coffee carrier and its stability, and the kinetic constants of the adsorption, were defined.

According to the obtained experimental results and a detailed literature review, it was found that the combination of the processes of adsorption and biodegradation may be considered a suitable choice for the purification of the dyed wastewater. Under optimal conditions of the adsorption of the crystal violet dye onto activated sugar beet pulp, the adsorption capacity reached 28,863 mg/g, while the maximal percent of the dye removal from solutions was achieved at 97,923 % onto the non-activated sugar beet pulp adsorbent. The optimal conditions of the maximal biodegradation of the dye by *Streptomyces microflavus* CKS6 strain were determined: the temperature of 30 °C, the pH of the dye solutions of 6 and the agitation at 120 rpm. The complete biodegradation of the solution of the dye concentration of 0,010 g/L was achieved after 12 h. Treated wastewater was completely safe and non-toxic to the environment.

The following proposal is that the modified coffee waste by the proposed oxidative agents could be used for immobilization of cellulase. The most effective carrier was reached by applying of chlorine dioxide, and the optimal conditions of the modification were: the time of the modification process of 30 min, the solution concentration of the chlorine dioxide of 25 %, and the activator/carrier ratio of 6 ml/mg. The maximum yield and efficiency of the immobilization of the cellulase from *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 of about 71 % and about 73 % were achieved, respectively.

The scientific contributions of this doctoral dissertation are in the possibility of development of the treatment of wastewater from the dye-using industries. Their complete treatment using the integrated process which is combined with the adsorption, through the application of the sugar beet pulp waste as a low-cost adsorbent, and the biodegradation of toxic cationic dye by strains of the genus *Streptomyces*.

The second scientific contributions are in the application of coffee waste as a carrier for the immobilization of biological molecules (the enzymes from the group of cellulases)

for their direct separation and purification from the complex media, in order to enhance their profitable application in industrial sector.

Keywords: sugar beet pulp, spent coffee residues, zeolite, crystal violet, adsorption, kinetics, isotherms, biodegradation, *Streptomyces*, saftanine T, cellulase, immobilization.

Scientific area: Technological engineering

Scientific discipline: Environmental engineering

UDC: 628.477:667.283.4:57.088:544.723.2

SADRŽAJ:

UVOD	1
TEORIJSKI DEO	4
1. ADSORPCIJA	4
1.1. POJAM PROCESA ADSORPCIJE	4
1.2. FAKTORI KOJI UTIČU NA PROCES ADSORPCIJE	5
1.2.1. UTICAJ MOLSKE JAČINE (PH) RASTVORA.....	5
1.2.2. UTICAJ POČETNE KONCENTRACIJE ADSORBATA.....	6
1.2.3. UTICAJ TEMPERATURE.....	6
1.2.4. UTICAJ KOLIČINE ADSORBENTA.....	7
1.2.5. UTICAJ STRUKTURE I VELIČINE ČESTICE ADSORBENTA.....	7
1.2.5.1. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenata.....	8
1.3. ADSORPCIONE TEHNIKE	9
1.3.1. ADSORPCIJA U ŠARŽNOM SISTEMU.....	9
1.3.2. ADSORPCIJA U KOLONI.....	10
1.4. ADSORPCIONA KINETIKA	10
1.4.1. MODELI PSEUDO-PRVOG I PSEUDO-DRUGOG REDA.....	11
1.4.2. ADSORPCIONI MEHANIZAM.....	13
1.5. ADSORPCIONA TERMODINAMIKA	14
1.6. ADSORPCIONA RAVNOTEŽA	15
1.6.1. LENGMIROV MODEL ADSORPCIONE IZOTERME.....	16
1.6.2. FROJNDLIHOV MODEL ADSORPCIONE IZOTERME.....	17
1.6.3. LENGMIR-FROJNDLIHOV MODEL ADSORPCIONE IZOTERME.....	17
1.6.4. TEMPKINOV MODEL ADSORPCIONE IZOTERME.....	18
1.6.5. DUBININ-RADUŠKEVIČOV MODEL ADSORPCIONE IZOTERME.....	19
1.7. VRSTE ADSORBENATA	19
1.7.1. KOMERCIJALNI ADSORBENTI.....	20
1.7.1.1. Aktivni ugalj.....	20
1.7.1.2. Polimerni adsorbenti.....	21

1.7.1.3. Oksidni adsorbenti.....	21
1.7.1.4. Silika gel	21
1.7.1.5. Sintetički zeolit.....	22
1.7.2. ALTERNATIVNI ADSORBENTI	22
1.7.2.1. Prirodni materijali.....	23
1.7.2.1.1. Ugalj.....	23
1.7.2.1.2. Glina.....	24
1.7.2.1.3. Silikatni materijali	24
1.7.2.1.4. Zeolit.....	24
1.7.2.1.5. Treset.....	25
1.7.2.2. Industrijski i komunalni nus-proizvodi/čvrst otpad.....	26
1.7.2.2.1. Pepeo.....	26
1.7.2.2.2. Otpad/nus-proizvodi iz industrije prerade drveta i papira	27
1.7.2.3. Agroindustrijski nus-proizvodi	27
1.7.2.3.1. Otpadna mikrobna biomasa.....	28
1.7.2.3.2. Otpadna kafa.....	29
1.7.2.3.3. Otpadna šećerna repa	31
2. INDUSTRIJSKE OBOJENE OTPADNE VODE	34
2.1. BOJE.....	35
2.1.1. ARILMETANSKE BOJE	38
2.1.1.1. Triarilmetanske boje.....	38
2.1.1.1.1. Kristal violet	39
2.1.2. AZINSKE BOJE.....	41
2.1.2.1. Safranin T.....	41
2.2. PREČIŠĆAVANJE INDUSTRIJSKIH OBOJENIH OTPADNIH VODA	42
2.2.1. POSTUPCI OBRADNE OTPADNIH VODA.....	42
2.2.2. ADSORPCIJA.....	43
2.2.3. BIORAZGRADNJA	46
2.2.3.1. Faktori koji utiču na biorazgradnju boja.....	48
2.2.3.1.1. Uticaj pH	48

2.2.3.1.2. Uticaj temperature	48
2.2.3.1.3. Uticaj početne koncentracije boje.....	49
2.2.3.1.4. Uticaj sadržaja azota u medijumu.....	49
2.2.3.1.5. Uticaj soli	49
2.2.3.1.6. Uticaj statičkih i dinamičkih uslova	50
2.2.3.2. Vrste biorazgradnje	50
2.2.3.2.1. Aerobna biorazgradnja.....	50
2.2.3.2.1.1. Rod Streptomyces	52
2.2.3.2.2. Anaerobna biorazgradnja	53
2.2.3.2.3. Kombinacija anaerobno/aerobne biorazgradnje	54
3. BIOLOŠKI AKTIVNI MOLEKULI-ENZIMI	55
3.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE.....	55
3.2. IMOBILIZACIJA ENZIMA	56
3.2.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE IMOBILIZACIJE ENZIMA	56
3.2.1.1. Imobilizacione tehnike.....	57
3.2.1.1.1. Kovalentna imobilizacija enzima	57
3.2.1.1.2. Imobilizacija enzima u polimerne matrice	58
3.2.1.1.3. Umrežavanje enzima.....	59
3.2.1.1.4. Inkapsulacija enzima.....	59
3.2.1.1.5. Imobilizacija enzima u membranama	60
3.3. CELULAZE.....	60
3.3.1. CELULAZNI KOMLEKS	60
3.3.2. PRIMENA CELULAZA.....	62
3.3.2.1. Imobilizacija celulaza	62
CILJ RADA	64
EKSPERIMENTALNI DEO	66
4. MATERIJALI I OPREMA.....	66
4.1. MATERIJALI:.....	66
4.2. HEMIKALIJE I REAGENSI:.....	66
4.3. OPREMA:.....	68

5. METODE.....	69
5.1. METODE ZA PRIPREMU UZORAKA	69
5.1.1. PRIPREMA BIOSORBENATA OD REPINIH REZANACA	69
5.1.2. PRIPREMA ADSORBENATA OD PRIRODNOG ZEOLITA	70
5.1.3. PRIPREMA NOSAČA OD OTPADNE KAFE.....	70
5.1.3.1. Obrada otpadne kafe	70
5.1.3.2. Modifikacija otpadne kafe oksidacionim sredstvima	70
5.1.3.3. PRIPREMA BAKTERIJSKIH KULTURA.....	71
5.1.4. PRIPREMA RADNIH RASTVORA	72
5.1.4.1. Vodeni rastvor adsorbata boje kristal violet	72
5.1.4.2. Vodeni rastvor adsorbata enzima celulaze.....	72
5.1.4.2.1. Vodeni rastvor komercijalne celulaze.....	72
5.1.4.2.2. Vodeni rastvor produkovane celulaze.....	72
5.1.4.3. Rastvori boja za biorazgradnju.....	73
5.1.4.4. Otpadna voda za biorazgradnju	73
5.2. DOKAZIVANJE PRISUSTVA ENZIMA I KVANTIFIKACIJA NJIHOVE AKTIVNOSTI	74
5.2.1. KVALITATIVNE METODE ZA ISPITIVANJE PROFILA ENZIMA MIKROBIOLOŠKIH KULTURA CKS6 I CKS7	74
5.2.1.1. Test za peroksidaze.....	74
5.2.1.2. Test za lignin-peroksidazu	75
5.2.1.3. Test za lakazu	76
5.2.1.4. Test API-ZIM.....	76
5.2.2. ODREĐIVANJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI	77
5.2.2.1. Određivanje lignin-peroksidazne aktivnosti	77
5.2.2.2. Određivanje mangan peroksidaze aktivnosti	77
5.2.2.3. Određivanje celulazne aktivnosti	78
5.3. ODREĐIVANJE FIZIČKO-HEMIJSKIH KARAKTERISTIKA ADSORBENTA	80
5.3.1. ODREĐIVANJE POVRŠINSKIH FUNKCIONALNIH GRUPA KORIŠĆENJEM FTIR TEHNIKE	80
5.3.2. ODREĐIVANJE POVRŠINSKOG NAELEKTRISANJA POMOĆU TAČKE pH_{pzc}	81
5.3.3. ODREĐIVANJE POVRŠINSKE STRUKTURE KORIŠĆENJEM TEHNIKE SEM	81

5.4. POSTUPAK PROCESA ADSORPCIJE U ŠARŽNOM REŽIMU	81
5.4.1. ADSORPCIJA BOJE KRISTAL VIOLET	82
5.4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA ADSORPCIJE.....	82
5.4.2.1. Optimizacija procesa adsorpcije boje kristal violet na repine rezance	85
5.4.2.2. Optimizacija procesa adsorpcije boje kristal violet na zeolitu.....	85
5.4.3. ADSORPCIJA ENZIMA CELULAZE	86
5.4.4. KINETIKA I MEHANIZAM PROCESA ADSORPCIJE.....	87
5.4.4.1. Kinetika procesa adsorpcije na repine rezance	87
5.4.4.2. Kinetika procesa adsorpcije na prirodnom zeolitu	88
5.4.4.3. Kinetika procesa adsorpcije na otpadnoj kafi	88
5.4.4.4. Analiza kinetičkih podataka.....	88
5.4.5. ADSORPCIONA RAVNOTEŽA I IZOTERME	89
Adsorpciona ravnoteža i izoterme korišćenjem repinih rezanaca	89
5.4.5.1. Adsorpciona ravnoteža i izoterme korišćenjem prirodnog zeolita.....	90
5.5. POSTUPAK PROCESA BIORAZGRADNJE U ŠARŽNOM REŽIMU.....	91
5.5.1. BIORAZGRADNJA KV BOJE KORIŠĆENJEM VRSTA RODA <i>STREPTOMYCES</i>	91
5.5.2. POSTUPAK ODREĐIVANJA FITOTOKSIČNOSTI RASTVORA KV BOJE I NJENIH RAZGRADNIH PROIZVODA NAKON BIODEGRADACIJE.....	92
5.5.3. BIORAZGRADNJA BOJE KV ADSORBOVANE NA OTPADNIM REPINIM REZANCIMA	92
6. REZULTATI I DISKUSIJA	94
6.1. ADSORPCIJA KATJONSKE BOJE KRISTAL VIOLET NA OTPADNE REPINE REZANCE	94
6.1.1. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE ADSORBENATA.....	94
6.1.1.1. Analiza površinskih funkcionalnih grupa	94
6.1.1.2. Potvrda adsorpcije boje kristal violet	95
6.1.1.3. Površinsko naelektrisanje adsorbenata	96
6.1.2. TOK REAKCIJE I POSTIZANJE RAVNOTEŽE	97
6.1.3. ADSORPCIONA KINETIKA I MEHANIZAM PROCESA ADSORPCIJE	99
6.1.4. ADSORPCIONE IZOTERME	103

6.1.5. OPTIMIZACIJA PROCESA ADSORPCIJE KORIŠĆENJEM METODOLOGIJE ODZIVNE POVRŠINE	105
6.1.5.1. Postavljanje modela eksperimenta	105
6.1.5.2. Ocena značajnosti modela i ulaznih procesnih parametara	106
6.1.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet	110
6.1.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjene boje iz rastvora.....	114
6.2. ADSORPCIJA KATJONSKE BOJE KRISTAL VIOLET NA PRIRODNOM ZEOLITU.....	118
6.2.1. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE ADSORBENATA.....	118
6.2.1.1. Analiza površinskih funkcionalnih grupa pre i nakon adsorpcije boje kristal violet 118	
6.2.1.2. Naelektrisanje površine adsorbenata	119
6.2.2. TOK REAKCIJE I POSTIZANJE RAVNOTEŽE	120
6.2.3. ADSORPCIONA KINETIKA I MEHANIZAM PROCESA ADSORPCIJE	122
6.2.4. ADSORPCIONE IZOTERME	126
6.2.5. OPTIMIZACIJA PROCESA ADSORPCIJE KORIŠĆENJEM METODOLOGIJE ODZIVNE POVRŠINE	128
6.2.5.1. Postavljanje modela eksperimenta	128
6.2.5.2. Ocena značajnosti modela i ulaznih procesnih parametara	128
6.2.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet	132
6.2.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjene boje iz rastvora.....	135
6.3. BIORAZGRADNJA KATJONSKE BOJE VRSTAMA RODA STREPTOMYCES.....	138
6.3.1. BIORAZGRADNJA BOJE KRISTAL VIOLET SOJEM <i>STREPTOMYCES FULVISSIMUS</i> CKS7	138
6.3.1.1. Enzimski profil soja.....	138
6.3.1.2. Uticaj procesnih parametara na biorazgradnju boje kristal violet.....	140
6.3.1.3. Fitotoksičnost biorazgradnih proizvoda	143
6.3.2. BIORAZGRADNJA KRISTAL VIOLET BOJE SOJEM <i>STREPTOMYCES MICROFLAVUS</i> CKS6 145	
6.3.2.1. Enzimski profil soja.....	145

6.3.2.2. Uticaj procesnih parametara na biorazgradnju boje kristal violet	146
6.3.2.3. Fitotoksičnost biorazgradnih proizvoda	150
6.3.2.4. Biorazgradnja boje adsorbovane na aktivirane repine rezance	151
6.3.3. MOGUĆNOST PONOVNE UPOTREBE BAKTERIJSKIH KULTURA ZA BIORAZGRADNJU BOJE KRISTAL VIOLET	153
6.3.4. BIORAZGRADNJA BOJE SAFRANIN T SOJEM <i>STREPTOMYCES MICROFLAVUS</i> CKS6	154
6.3.4.1. Uticaj procesnih parametara na biorazgradnju boje safranin T	154
6.3.4.2. Fitotoksičnost biorazgradnih proizvoda	157
6.3.5. BIORAZGRADNJA OTPADNE VODE NASTALE NAKON BOJENJA MIKROORGANIZAMA.	158
6.3.6. MEHANIZAM BIORAZGRADNJE KATJONSKIH BOJA BAKTERIJSKIM KULTURAMA RODA <i>STREPTOMYCES</i>	159
6.3.6.1. Mehanizam biorazgradnje boje kristal violet	159
6.3.6.2. Mehanizam biorazgradnje boje safranin T	161
6.4. ADSORPCIJA ENZIMA CELULAZE NA OTPADNU KAFU	163
6.4.1. ADSORPCIJA KOMERCIJALNE CELULAZE POREKLOM IZ <i>TRICHODERMA REESEI</i>	163
6.4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike modifikovanih adsorbenata	164
6.4.1.1.1. Analiza površinskih funkcionalnih grupa	164
6.4.1.1.2. Naelektrisanje površine	165
6.4.1.1.3. Prikaz izgleda i strukture aktivne površine	166
6.4.1.1.4. Potvrda imobilizacije komercijalne celulaze na otpadnoj kafi-ClO ₂	168
6.4.1.2. Uticaj modifikacije nosača na imobilizaciju komercijalne celulaze	168
6.4.1.3. Uticaj procesnih parametara na modifikaciju adsorbenta (otpadna kafa-ClO ₂) .	170
6.4.1.4. Tok reakcije i postizanje ravnoteže	173
6.4.1.5. Adsorpciona kinetika i mehanizam procesa adsorpcije celulaze	174
6.4.2. ADSORPCIJA CELULAZE SINTETISANE POMOĆU SOJA <i>PAENIBACILLUS CHITINOLYTICUS</i> CKS1	176
6.4.2.1. Uticaj procesnih parametara na imobilizaciju celulaze iz CKS1	176
6.4.2.2. Potvrda imobilizacije celulaze iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO ₂	181
6.4.2.3. Tok reakcije i postizanje ravnoteže	182
6.4.2.4. Adsorpciona kinetika i mehanizam procesa adsorpcije celulaze iz CKS1	183

6.4.2.5. Stabilnost imobilisane celulaze	186
7. ZAKLJUČAK.....	187
LITERATURA	191
PRILOG 1	214
PRILOG 2	218
PRILOG 3	220
PRILOG 4	221
PRILOG 5	222
PRILOG 6	224

UVOD

Brza industrijalizacija širom sveta i konstantni porast nemarnog ponašanja ljudi, za posledicu ima zagađenost vode i okolnog zemljišta toksičnim industrijskim hemikalijama. Uticaji industrijskih boja na ekosisteme su od velikog javnog zdravstvenog značaja i veliki razlog za brigu. Pored toga što obojene otpadne vode narušavaju prirodnu estetiku vodotokova, one mogu povećati šansu njihovog opasnog uticaja na vodenu floru i faunu. Boje obično imaju složenu aromatičnu strukturu molekula, koje uključuju metale i druge komponente, koje ih čine stabilnijim i teško razgradivim [1-3]. Kristal violet (KV) je katjonska boja koja se rastvara u vodi i upotrebljava za različite namene, uglavnom za bojenje različitih proizvoda. Prisustvo KV boje u otpadnim vodama u veoma niskim koncentracijama (manjim od 1 mg/l) je vidljiva, nepoželjna i ne može se lako ukloniti konvencionalnim sistemima za prečišćavanje. Među brojnim dostupnim fizičkim i hemijskim tehnikama, postoje ograničenja u njihovoj primeni zbog komplikovanih procedura izvodljivosti ili ekonomske neisplativosti. Fenomenu adsorpcije se zato i dalje dodeljuje epitet obećavajuće tehnologije za brzo i trajno uklanjanje ovog tipa zagađivača iz otpadnih voda, nudeći nekoliko atraktivnih prednosti [1-7]. Osim toga, adsorpcija zajedno sa biorazgradnjom, mogla bi da obezbedi potpunu dekompoziciju boje, ostavljajući netoksične ostatke, čime se rešava i problem odlaganja adsorbenta sa akumuliranom bojom. Biološka obrada obojenih otpadnih voda, vodi se kao efikasan predlog tehnologije prečišćavanja otpadnih voda, zbog svoje reputacije kao jeftine, ekološke i javno prihvatljive metode [4, 8, 9]. Biološki procesi biorazgradnje, zbog mikrobiološke genetičke i metaboličke raznovrsnosti, imaju potencijal da konvertuju ili razgrade zagađivače u bezopasne supstance, kao što su voda, ugljendioksid i različite neorganske soli. Trenutno, opsežna istraživanja su fokusirana na pronalazak jeftine i efikasne metode koja bi koristila visoko efikasne mikroorganizme sposobne da razgradnju boje širokog spektra. Pored toga, primena mikrobioloških ćelija u odnosu na izolovane enzime nudi prednost jer su značajno smanjeni troškovi koji su vezani za izolovanje i prečišćavanje enzima. Takođe, proces razgradnje se češće odigrava sa brojnim enzimima koji rade sekvencionalno, umesto korišćenja jednog specifičnog enzima posebno [4, 9-11].

U agroindustriji nastaje velika količina različitih otpadnih materijala biljnog i životinjskog porekla. Okarakterisani su kao visoko specifičan otpad, čije je, korišćenje i odlaganje teško. Procenjuje se da se godišnje proizvede preko 320×10^9 t agroindustrijskog otpada. Ovaj tip otpada je obnovljiv, obično dostupan u velikim količinama i potencijalno jeftiniji od drugih materijala. U vezi sa tim, danas se često eksploatišu u istraživanjima adsorpcije za uklanjanje različitih tipova uobičajnih kontaminata pronađenih u vodotokovima, kako bi zamenili komercijalni aktivni uglj (KAU) u njegovoj primeni [1, 3, 7, 12-17].

Repini rezanci i otpadna kafa predstavljaju celulozni nus-proizvod industrije prerade šećerne repe i pripreme napitka od kafe. Najvećim delom repini rezanci sadrže polisaharide, koji su, zajedno sa njihovim modifikovanim proizvodima, zbog karboksilnih grupa na galakturonskoj kiselini, najverovatnije odgovorni za sposobnost adsorpcije katjona. Neki istraživači su naglasili da karbonizacija repinih rezanaca, tehnikama pirolize sa različitim hemikalijama, mogu dodatno povećati adsorpcioni kapacitet i fizičku stabilnost nosača. Otpadna kafa se posebno pokazala efikasnim adsorbentom za boje, polifenole i pesticide, nakon ekstrakcije bioaktivnih sastojaka mikrotalasnom ekstrakcijom [18-23]. Što se tiče novih mogućnosti njihove primene, otvaraju se u oblasti imobilizacije različitih bioloških molekula, kao što su enzimi. S obzirom na hemijski sastav repinih rezanaca i otpadne kafe, u kojima je pretežno zastupljena hemiceluloza i celuloza, enzimi za koje bi ovi nus-proizvodi bili potencijalno pogodan nosač su iz grupe celulaza.

Predmet ove doktorske disertacije je valorizacija čvrstih agroindustrijskih nus-proizvoda: repinih rezanaca i otpadne kafe. Cilj je da se otpadni repini rezanci iskoriste kao alternativni adsorbent za uklanjanje KV boje iz otpadnih voda, a talog od kafe kao nosač za adsorpciju enzima celulaze. U vezi s tim, istraživanja su podeljena u tri dela. U prvom su optimizovani uslovi adsorpcije boje KV na otpadne repine rezance, koji su korišćeni u nativnom i aktiviranom obliku, pomoću mikrotalasa. Definisani su kapacitet vezivanja boje, kao i odgovarajući kinetički i ravnotežni parametri. Za optimizaciju procesa primenjena je statistička metoda odzivne površine. U cilju efikasnosti primene aktivnog uglja od repinih rezanaca, upoređeni su kapaciteti vezivanja boje sa zeolitom, predstavnikom adsorbenata neorganskog porekla. Za potpunu obradu otpadne vode

integriranim procesom adsorpcije i biorazgradnje, u drugom delu uključene su vrste *Streptomyces microflavus* CKS6 (CKS6) i *Streptomyces fulvissimus* CKS7 (CKS7). Utvrđeni su uslovi maksimalne biorazgradnje boje KV preko procenata uklanjanja boje iz vodenog rastvora, kao i fitotoksičnost nastalih razgradnih proizvoda. U trećem delu je otpadna kafa iskorišćena kao nosač za enzime celulaze iz komercijalno dostupne *Trichoderma reesei* i celulaze iz prirodnog izolata *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 (CKS1). U cilju postizanja maksimalnog prinosa i efikasnosti imobilizacije enzima na kafi, nosač je modifikovan korišćenjem jakih oksidacionih sredstava, i to: glutraldehida, hlor-dioksida i vodonik-peroksida.

TEORIJSKI DEO

1. ADSORPCIJA

1.1. Pojam procesa adsorpcije

Adsorpcija predstavlja jedan dobro poznat proces ravnotežnog razdvajanja, odnosno proces akumulacije hemijske vrste na graničnoj površini između dve faze (tečno-čvrsto ili gasovito-čvrsto). Osnovni pojmovi u teoriji procesa adsorpcije, pored pomenute adsorpcije, su i: adsorbat, adsorbent i desorpcija. Supstanca koja se akumulira na interfejsu naziva se adsorbat, dok je adsorbent čvrsta supstanca na kojoj se dešava proces adsorpcije. Obrnuti proces od procesa adsorpcije označen je kao proces desorpcije. Promenom karakteristika neke od faza, na primer tečne faze (koncentracije, temperature, pH), adsorbovana vrsta može biti otpuštena sa površine adsorbenta i prebačena nazad u tečnu fazu. Proces adsorpcije zavisi kako od osobina adsorbenata, tako i od osobina adsorbata, ali i od uslova sredine u kojoj se proces odvija [24-27].

Prve kvantitativne studije procesa adsorpcije datiraju iz osamdesetih godina XVIII veka, gde su se drveni ugalj i glina koristili za uklanjanje gasova. U literaturi, pojam adsorpcije prvi uvodi Kajzer (*Kayser*) krajem XIX veka, i od tada se proces adsorpcije široko primenjuje, kako za uklanjanje rastvorene supstance iz rastvora, tako i za uklanjanje gasova iz atmosfere [25].

Proces adsorpcije predstavlja jednu efikasnu tehniku koja se uspešno primenjuje za izdvajanje različitih zagađujućih supstanci iz kontaminiranih voda, kao i drugih hemijskih vrsta iz vodenog rastvora. Tokom procesa adsorpcije, primenjuje se čvrst adsorbent da privuče rastvorenu komponentu na svojoj površini kako bi je konačno uklonio iz vodenog rastvora, formiranjem fizičkih i/ili hemijskih veza. Na njegovoj površini postoje nebalansirane sile privlačenja koje su odgovorne za proces adsorpcije [25, 28, 29]. Dakle, postoje aktivna, energetska bogata mesta koja su sposobna da interaguju sa rastvorenim supstancama zbog svojih specifičnih elektronskih i prostornih karakteristika [27]. Ukoliko je privlačenje između čvrste površine adsorbenta i adsorbovane supstance fizičke prirode,

proces adsorpcije se naziva fizička adsorpcija ili fiziosorpcija. Najčešće sile koje su odgovorne za ovaj tip adsorpcije su: van der Valsove (*van der Waals*) sile, vodonične veze, polaritet, interakcija dipol-dipol Π - Π i druge. One su slabe, pa je fizička adsorpcija, u većini slučajeva, reverzibilan proces. Sa druge strane, ako se ove interakcije između adsorbenta i molekula ili jona adsorbata ostvaruju preko jakih hemijskih veza, proces adsorpcije se naziva hemijska adsorpcija ili hemisorpcija. S obzirom na to što su ove sile jače, najčešće dolazi do razmena elektrona na površini adsorbenta. Adsorbovani molekuli ili joni se samim tim teško odvajaju sa površine adsorbenta, čineći proces hemijske adsorpcije u mnogim slučajevima ireverzibilnim [12, 30].

1.2. Faktori koji utiču na proces adsorpcije

Na efikasnost procesa adsorpcije mogu da utiču mnogi faktori, kao što su: interakcija adsorbat-adsorbent, površina adsorbenta, odnos količine adsorbenta i adsorbata u sistemu, veličina čestica adsorbenta, pH rastvora, temperatura pod kojom se proces odvija, dinamika i vreme njegovog trajanja. Uvek treba uzeti u obzir i ispitati uticaje svih ovih parametara, radi uspešne primene procesa adsorpcije za izdvajanje neke supstance iz vodenog rastvora. Takođe, da bi proces bio uspešan i primenljiv, parametri procesa moraju biti optimizovani jer se na taj način pruža mogućnost predviđanja ponašanja celokupnog sistema pri različitim vrednostima procesnih parametara [30].

1.2.1. Uticaj molske jačine (pH) rastvora

Uticaj pH rastvora je jedan od najvažnijih faktora koji utiče na efikasnost procesa adsorpcije, pre svega na adsorpcioni kapacitet jonskih vrsta adsorbentom. Promenom pH u rastvoru dolazi do variranja, kako stepena jonizacije molekula koji se adsorbuje, tako i površinskih svojstava adsorbenta. Sa porastom pH, kisele aktivne grupe adsorbenta (karboksilne, hidroksilne, i druge) disosuju. Površina adsorbenta postaje negativno naelektrisana i omogućava se adsorpcija katjonskih vrsta. U suprotnom, adsorbuju se anjonske vrste. U vezi s tim, određivanje ukupnog naelektrisanja površine adsorbenta, kao i određivanje protonizacionog i deprotonizacionog ponašanja adsorbenta u vodenim

rastvorima, može biti veoma značajno i korisno za proces adsorpcije i za razumevanje i objašnjenje adsorpcionih mehanizama. pH vrednost pri kojoj je, na površini adsorbenta, koncentracija negativnog i pozitivnog naelektrisanja jednaka, predstavlja tačku nultog naelektrisanja, pH_{pzc} . Dakle, na ovoj tački je ukupna količina površinskog naelektrisanja jednaka nuli. Za pH vrednost ispod pH_{pzc} površina adsorbenta je pozitivno naelektrisana i može reagovati sa negativno naelektrisanim hemijskim vrstama (na primer anjonske boje), dok je za vrednosti iznad pH_{pzc} površina negativna i može reagovati sa pozitivnim jonima iz okolne vodene sredine [24, 30].

Što se tiče disocijacije molekula adsorbata, tačnije disocijacije molekula boje, pokazala se kao manje značajna za proces adsorpcije. Ne treba zaboraviti i to da molekuli boje imaju često jako kisele ili bazne grupe (sulfonske), čiji stepen disocijacije ostaje praktično nepromenjen za širok opseg pH vrednosti [13, 30].

1.2.2. Uticaj početne koncentracije adsorbata

Količina adsorbovane supstance koja će se izdvojiti procesom adsorpcije veoma zavisi od njene početne koncentracije u vodenom rastvoru. Uticaj početne koncentracije adsorbata na proces adsorpcije zavisi od neposrednog odnosa između koncentracije adsorbata i slobodnih i dostupnih aktivnih mesta na površini adsorbenta. Uopšteno, procenat izdvajanja adsorbata opada sa porastom njihove početne koncentracije u sistemu. Uzrok ovakvog ponašanja je najverovatnije zasićenost dostupnih adsorpcionih mesta na površini adsorbenta. Na adsorpcioni kapacitet adsorbenta, porast početne koncentracije adsorbata utiče obrnuto, raste. Ovakvo ponašanje je verovatno posledica visoke pokretačke snage prenosa mase pri visokim koncentracijama rastvorene supstance [30].

1.2.3. Uticaj temperature

Uticaj temperature je još jedan važan fizičko-hemijski parametar procesa adsorpcije. Temperatura utiče na promenu adsorpcionog kapaciteta adsorbenta. Ako tokom procesa adsorpcije, količina izdvojene adsorbovane supstance raste sa porastom temperature, onda je proces adsorpcije endoterman. Ovakva pojava može biti uzrok povećanja mobilnosti molekula adsorbata, kao i povećanja broja aktivnih mesta na površini

adsorbenta. Dok smanjenje količine adsorbovane supstance, tokom procesa adsorpcije sa porastom temperature, ukazuje na to da je proces adsorpcije egzoterman. Ova pojava je posledica smanjene adsorpcione snage između molekula adsorbata i aktivnih mesta na površini adsorbenta [30].

1.2.4. Uticaj količine adsorbenta

Adsorbent, kao procesni parameter, je veoma bitan kada se utvrđuje adsorpcioni kapacitet adsorbenta za zadatu količinu adsorbata koji se koristi pri zadatim uslovima rada. Procenat izdvajanja adsorbata raste sa porastom količine adsorbenta jer se samim tim povećava i količina aktivnih adsorpcionih mesta na površini adsorbenta sa povećanjem doze adsorbenta. Ispitivanje uticaja ovog faktora na adsorpciju hemijske vrste je u ideji o sposobnosti da se adsorbat izdvoji iz vodenog rastvora sa upotrebom što manje količine adsorbenta. Sa ekonomske strane gledano, ova činjenica je jako bitna kada se koriste skupi adsorbenti, kao na primer oni komercijalni i sintetisani [30].

1.2.5. Uticaj strukture i veličine čestice adsorbenta

Da bi adsorbent bio efikasan u uklanjanju komponenata iz vodenih rastvora, mora da poseduje i niz karakteristika. Pošto je proces adsorpcije proces površina, ključni parametar kvaliteta adsorbenta je sama njegova površina (struktura i hemijska priroda). Efikasan adsorbent mora da poseduje i dobre mehaničke karakteristike (jačina i otpornost na trenje), kao i dobra kinetička svojstva. Dakle, treba da omogući brz transfer molekula adsorbata do adsorpcionih aktivnih mesta adsorbenta i od kojih će zavisi obim adsorpcije [27, 31].

Preduslov za veliku površinu adsorbenta je posedovanje porozne strukture. Ovakva struktura materijala omogućava da na adsorbentu razlikujemo dve vrste površina, spoljašnju i unutrašnju. Oblast spoljašnje površine poroznih adsorbenata obično je mnogo puta manja od oblasti unutrašnje površine, koju čine zidovi pora. U proseku, spoljašnja površina adsorbenta se kreće ispod $1 \text{ m}^2/\text{g}$, što je čini manje značajnom. Nasuprot tome, ukupna unutrašnja površina se kreće između 10^2 i $10^3 \text{ m}^2/\text{g}$. Za prirodne adsorbente obično važi da imaju mnogo manju ukupnu površinu od veoma poroznih, sintetisanih ili

komercijanih adsorbenata [26, 27, 31]. Takođe, efikasnost adsorbenta se ogleda i u dostupnosti unutrašnje površine za adsorbate, što zavisi od veličine molekula adsorbata i veličine pore adsorbenta. Veličina pora poroznih materijala varira i mogu se razlikovati: makropore ($\text{Ø} > 50 \text{ nm}$), mezopore ($\text{Ø} 2\text{-}50 \text{ nm}$) i mikropore ($\text{Ø} < 2 \text{ nm}$). Makropore i mezopore su prvenstveno relevantne za transfer adsorbata u unutrašnjost čestice adsorbenta. Unutrašnja površina adsorbenta se po pravilu povećava sa porastom zapremine mikropora. Veća zapremina mikropora znači i veća količina adsorbata koja se može izdvojiti iz vodenog rastvora. U vezi s tim, gotovo celokupni adsorpcioni kapacitet adsorbenta obezbeđuje njegova unutrašnja površina imože se reći da je unutrašnja površina veoma važna karakteristika koja adsorbentu daje njegov kvalitet i efikasnost [26, 31].

Adsorbenti mogu biti različitih oblika i dimenzija. Na primer, postoje adsorbenti u obliku kuglica ili granula, peleta, ljuspica, praha, vlakana, gela. Modifikacijom adsorbenata mogu se poboljšati njegove adsorpcione sposobnosti. Tom prilikom se koriste različiti tretmani modifikacije, kao što su mehanički i/ili hemijski ili neki drugi predtretmani. Na primer, različite procedure kao što su mlevenje, isparavanje, natapanje u amonijaku ili druga alkalna natapanja delignifikuju ili povećavaju površinu alternativnih adsorbenata. Ipak, mlevenje se smatra jednom od najisplativijih procedura koja se često primenjuje za poboljšanje efikasnosti adsorpcije boje kod alternativnih adsorbenata [12, 13].

1.2.5.1. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenata

Proučavanje aktivne površine adsorbenta, građe njegovih aktivnih centara, kao i njihova reaktivnost, su od velikog značaja za primenu određenog adsorbenta. Takođe, informacije o fizičko-hemijskim karakteristikama adsorbenta olakšavaju mogućnost njihove ciljane modifikacije u zavisnosti od oblasti primene.

Postoji veliki broj metoda za određivanje karakteristika složenih struktura adsorbenta. One se zasnivaju na kiselinsko-baznim titracijama, instrumentalnim tehnikama (primena razne vrste zračenja ili jako elektromagnetno polje), sistemima za ispitivanje termodinamičkih parametara itd. Primena jedne metode nije dovoljna za potpunu karakterizaciju nekog adsorbenta, pa se u praksi najčešće koriste bar dve ili više njih [32]:

- određivanje specifične površine i zapremine pora adsorbenta,

- analiza elemenata i njihovog udela u strukturi adsorbenta (sagorevanjem materijala),
- karakterizacija površine adsorbenta - oksidovane površinske grupe (Boemovom (*Boehm*) titracijom), kisela i bazna mesta na površini adsorbenta (kiselinsko-baznom titracijom), tačka nultog naelektrisanja (pH_{pzc}), infracrvena spektroskopija (FT-IR), skeniranje elektronskim mikroskopom (SEM),
- merenje gustine adsorbenta (čvrste faze),
 - određivanje nivoa aktivacije adsorbenta (Jodov broj) i druge.

1.3. Adsorpcione tehnike

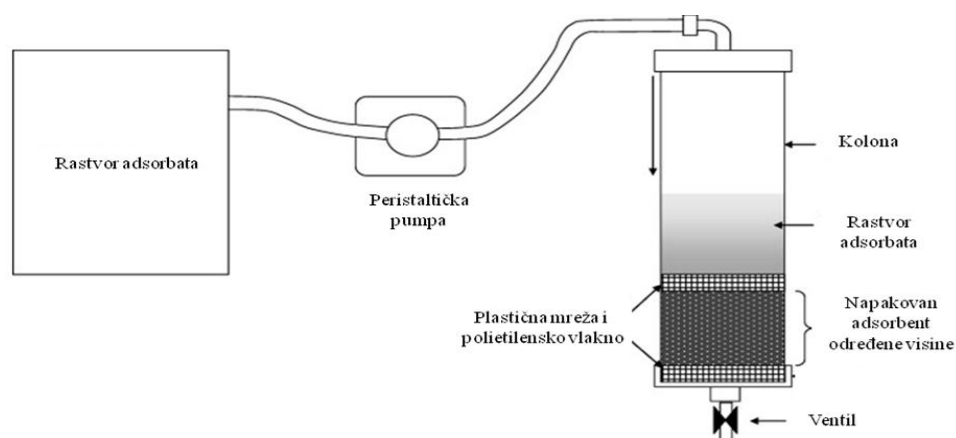
Proces adsorpcije može se izvesti na dva načina: u reaktorima sa mešanjem (u šaržnom sistemu) ili u adsorpcionim kolonama. Koji od načina će biti odabran, zavisi od više faktora. Na prvom mestu, zavisi od izbora adsorbenta i adsorbata, a zatim i od ekonomskog aspekta (investicioni troškovi, efikasnost i isplativost).

1.3.1. Adsorpcija u šaržnom sistemu

Proces adsorpcije u šaržnom sistemu odigrava se u sudu sa mešanjem ili u kontinualnom ili u diskontinualnom režimu. Kod kontinualnog procesa adsorpcije, vrši se višestepeno prečišćavanje ili separacija adsorbata. Adsorbent se iz sistema uklanja u različitim vremenskim intervalima i zamenjuje novim. Tom prilikom adsorbent je neravnomerno opterećen adsorbatom, a adsorpcioni kapacitet adsorbenta nije iskorišćen u potpunosti. Takođe, operativni troškovi kontinualnog režima su veći, pa se i iz tih razloga ređe primenjuje. Sa druge strane, diskontinualni režim je pogodniji, jer se adsorbent uklanja iz sistema nakon postizanja ravnoteže i njegovog maksimalnog iskorišćenja. Dakle, nema protoka ulaska i izlaska iz sistema. Iskorišćeni adsorbent se uklanja filtracijom ili sedimentacijom, nakon čega biva regenerisan za ponovnu upotrebu ili biva odbačen. Gledano sa ekonomske strane, adsorpcija u šaržnom režimu je efikasna kada je reč o kratkim optimalnim vremenskim intervalima primene i zahteva veliku količinu adsorbenta za velike količine otpadne vode [32, 33].

1.3.2. Adsorpcija u koloni

Adsorpcija u koloni je kontinualni tip procesa adsorpcije u kome čvrsta faza može biti nepokretna ili pokretna. Kolonska adsorpcija, u odnosu na adsorpciju u šaržnom režimu, nudi realnu simulaciju procesa i smatra se praktičnijom i ekonomski isplativijom tehnikom u prečišćavanju otpadnih voda. Sa stanovišta industrijske primene, kolonska adsorpcija sa nepokretnom čvrstom fazom je često poželjnija, jer je rezultat iskorišćenja adsorpcionog kapaciteta adsorbenta i kvaliteta otpadne vode daleko bolji (**slika 1.1.**) [33, 34].



Slika 1.1. Šematski prikaz kolonske adsorpcije sa nepokretnom čvrstom fazom [33]

Što se tiče adsorpcije u koloni sa pokretnom čvrstom fazom, adsorbent i rastvor adsorbata se uvode u sistem na suprotnim krajevima. Adsorbent prolazi kroz sistem od vrha ka dnu, bez zadržavanja u suspenziji i uklanja se iz sistema s vremena na vreme. Prednost ove kolonske adsorpcije je u tome što adsorbent ne mora biti praškast, a rastvor adsorbata može sadržati i čvrste čestice. Nedostatak u njegovoj primeni, ogleda se u tome što sa ekonomskih aspekata nije povoljan jer su investicioni troškovi veliki [32].

1.4. Adsorpciona kinetika

Adsorpcioni procesi su relativno brzi procesi u kojima se adsorbat izdvaja, od strane adsorbenta, u vremenskom periodu od nekoliko (desetina) minuta ili sati. Ređe je slučaj da proces traje danima. Samim tim, što je kraće vreme adsorpcije, korišćeni

adsorbent se smatra boljim i uspešnijim. Za određivanje kinetičkih modela koriste se kontrolni mehanizmi procesa adsorpcije, kao što su hemijske reakcije, kontrola difuzije ili koeficijent prenosa mase. Odnosno, adsorpcioni kinetički modeli se primenjuju kako bi se interpretirali eksperimentalni podaci, u cilju određivanja kontrolnih mehanizama adsorpcije datog adsorbata iz vodenog rastvora korišćenim adsorbentom. Studijom adsorpcione kinetike se ilustruje brzina izdvajanja adsorbata, kao i kako ova brzina kontroliše vreme boravka adsorbata na interfejsu rastvora. Preduslov za izbor najboljih radnih uslova i dizajniranje uspešnog adsorpcionog sistema je proučavanje adsorpcione kinetike adsorbata na adsorbentima. Tako se kinetika adsorpcije anjonskih i katjonskih supstanci na različitim adsorbentima analizira korišćenjem različitih kinetičkih modela [30].

1.4.1. Modeli pseudo-prvog i pseudo-drugog reda

Adsorpciona kinetika se matematički najčešće izražava primenom dva kinetička modela: modelom pseudo-prvog reda i modelom pseudo-drugog reda. Ovi modeli se koriste da objasne adsorpciju adsorbata na površini čvrstih adsorbenata. Često se dovodi u pitanje primena jednog kinetičkog modela za adsorpciju zbog raznolikosti adsorpcionih površina i adsorpcionih fenomena [13].

Jednačine kinetičkih modela pseudo-prvog reda i pseudo-drugog reda prikazane su redom sledećim jednačinama:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (1.1)$$

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (1.2)$$

gde su q_e i q_t (mg/g) količine adsorbovanog adsorbata po jedinici mase adsorbenta u ravnotežnom vremenu i vremenu t (min), a k_1 (1/min) i k_2 (g/mg·min) konstante pseudo-prvog i pseudo-drugog kinetičkog reda. Jednačina pseudo-prvog reda ili Lagergrenova (*Lagergren's*) kinetička jednačina često se koristi za adsorpciju adsorbata iz vodenih rastvora. Ova kinetika je zasnovana na pretpostavci da je brzina promene izdvajanja iz rastvora sa vremenom direktno proporcionalna razlici u koncentraciji pri zasićenju i količine adsorbovanog adsorbata sa vremenom. U većini slučajeva, ovaj kinetički model ne može dobro aproksimirati sistem na celom opsegu vremena kontakta adsorbenta i

adsorbata, dok se jednačinom modela pseudo-drugog reda ili Ho (*Ho*) i Mek Kajovom (*McKay*) može predvideti ponašanje u sistemu na čitavom opsegu trajanja adsorpcije [35].

Često se jednačine kinetičkih modela prikazuju u svom linearnom obliku. Linearni oblici kinetičkih modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda prikazani su sledećim jednačinama, redom [21]:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (1.3)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (1.4)$$

Na osnovu kinetičkog modela pseudo-prvog reda, grafička zavisnost $\log(q_e - q_t)$ od vremena t daje linearnu vezu. Iz nagiba grafika može se odrediti vrednost konstante (k_1), dok se predviđena vrednost q_e izračunava iz odsečka (**jednačina 1.3**). Linearna veza kod kinetičkog modela pseudo-drugog reda, dobija se iz zavisnosti t/q_t od vremena t . Iz vrednosti odsečka grafika izračunava se vrednost konstante (k_2), a iz nagiba grafika q_e (**jednačina 1.4**) [30].

Početa adsorpciona brzina, h (mg/g-min) se može izračunati uz pomoć konstante brzine pseudo-drugog reda kada $t \rightarrow 0$ i to pomoću sledeće jednačine [30]:

$$h = k_2 q_e^2 \quad (1.5)$$

Generalno gledano, najbolje uklapanje nekog od kinetičkih modela, za zadati proces adsorpcije hemijske vrste, se bira na osnovu vrednosti koeficijenta korelacije linearne regresije R^2 . Pored ovog parametra, primenljivost različitih kinetičkih modela se utvrđuje i kroz analizu sume kvadratnih grešaka (SKG, %), koja se izračunava sledećom jednačinom:

$$SKG (\%) = \sqrt{\frac{\sum (q_{e,exp} - q_{e,cal})^2}{N}} \quad (1.6)$$

gde je N broj tačaka podataka. Najveća vrednost za R^2 i najmanja vrednost za SKG (%) predstavljaju dobar pokazatelj uklapanja nekog kinetičkog modela zdatom procesu adsorpcije. U većini slučajeva, kinetički model pseudo-drugog reda je zastupljeniji kod adsorpcionih sistema [30].

1.4.2. Adsorpcioni mehanizam

Međučestični difuzioni model obično se koristi za identifikaciju adsorpcionih mehanizama za potrebe dizajniranja sistema. Izdvajanje adsorbata iz vodenih rastvora adsorpcijom uključuje nekoliko procesa prenosa mase u tečnoj fazi i na čvrstom-tečnom interfejsu. Adsorpcioni proces uključuje četiri uzastopna koraka [13]:

1. prenos adsorbata iz vodenog rastvora do graničnog sloja koji okružuje čestice adsorbenta,
2. difuzioni film, odnosno prenos adsorbata kroz granični sloj,
3. difuzija adsorbata u pore adsorbenta i
4. adsorpcija adsorbata na unutrašnju aktivnu površinu pora adsorbenta, kao i njegova desorpcija.

Ukupna stopa adsorpcije je kontrolisana od strane najsporijih koraka. Pretpostavlja se da je poslednji korak dovoljno brz i da se može zanemariti. Dakle, ograničavajući korak je ili difuzija filma ili difuzija čestica. Stopa difuzije se može izraziti kao kvadratni koren vremena. Matematička zavisnost q_t prema $t^{0.5}$ se dobija ako se smatra da je adsorpcioni proces pod uticajem difuzije sferičnih čestica i konvektivne difuzije u rastvoru [13]. Prema Veberu (*Weber*) i Morisu (*Morris*), za većinu procesa adsorpcije važi da količina adsorpcije varira gotovo proporcionalno sa $t^{1/2}$, nego sa vremenom kontakta (t) i može se izraziti sledećom jednačinom:

$$q_t = k_{ID}t^{1/2} + C_i \quad (1.7)$$

gde je q_t adsorpcioni kapacitet u vremenu t , $t^{1/2}$ je vreme poluživota (s) i k_{ID} ($\text{mg/g}\cdot\text{h}^{1/2}$) je konstanta brzine međučestične difuzije na i -tom nivou. Veber-Morisov grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$, daje linearnu zavisnost ukoliko dolazi do međučestične difuzije. Na osnovu nagiba prave ove funkcije, može se izračunati konstanta brzine međučestične difuzije (k_{ID}). Ukoliko prava prolazi kroz koordinatni početak, jedini kontrolišući korak adsorpcije je posledica međučestične difuzije. U suprotnom, podrazumeva se da je i neki drugi mehanizam, zajedno sa međučestičnom difuzijom, uključen u proces adsorpcije. C_i je efekat graničnog sloja i ukoliko je odsečak prave veći, veći je i doprinos površinske adsorpcije u ograničavajućem koraku [2, 30].

Dakle, **jednačinom 1.7** smatra se da je proces adsorpcije kontrolisan od strane međučestične difuzije sa mogućim doprinosom i spoljašnje difuzije. Grafik zavisnosti kvadratnog korena vremena se sastoji uglavnom iz dva (čak i više) odvojenih linearnih delova sa različitim nagibima. Višelinearnost se tumači kao dokaz da međučestična difuzija nije jedini korak koji ograničava brzinu, već da je i spoljašnji prenos masa takođe značajan za proces adsorpcije adsorbata [13].

1.5. Adsorpciona termodinamika

Termodinamičkom analizom se određuje da li se posmatrani proces adsorpcije odigrava spontano ili ne. Ispituju se promena slobodne Gibsove (*Gibbs*) energije (ΔG), promena entalpije (ΔH) i promena entropije (ΔS) u zavisnosti od uticaja temperature na proces adsorpcije. Dakle, dobijaju se iz ravnotežnih adsorpcionih konstanti na različitim testiranim temperaturama. Slobodna Gibsova energija određuje se sledećom jednačinom:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (1.8)$$

gde je ΔG° (J) promena standardne slobodne Gibsove energije, R je univerzalna gasna konstanta (8.314 J/(mol K)), T je apsolutna temperatura (K) i K je ravnotežna adsorpciona konstanta u molarnim jedinicama (M^{-1}) iz Lengmirovog (*Langmuir*) modela [32].

Veza između ravnotežne adsorpcione konstante i apsolutne temperature može se opisati pomoću vant Hofove (*van 't Hoff*) **jednačine 1.9**, a vrednosti entalpije i entropije se izračunavaju iz nagiba i odsečka prave $\Delta G^\circ - T$:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (1.9)$$

Ukoliko je promena entalpije (ΔH°) i entropije (ΔS°) pozitivna vrednost, onda je proces endoterman i upućuje na dobar afinitet adsorbata prema adsorbentu. Sa druge strane, ukoliko je promena entalpije (ΔH°), entropije (ΔS°) i energije (ΔG°) negativna vrednost, tada je proces egzoterman, afinitet adsorbata prema adsorbentu lošiji, a proces spontan na ispitivanom temperaturnom opsegu [36].

1.6. Adsorpciona ravnoteža

Tokom procesa adsorpcije, rastvorena supstanca se prenosi iz rastvora na površinu čvrste faze adsorbenta, čija koncentracija raste do postizanja dinamičke ravnoteže. U ravnotežnom stanju, postoji definisana distribucija adsorbata između tečne i čvrste faze. Funkcija distribucije adsorbata predstavlja adsorpcionu izotermu. Dakle, adsorpciona izoterma je konstantni temperaturni ravnotežni odnos između količine adsorbata po jedinici adsorbenta ili kapacitet adsorbenta (q_e , mg/g) i njihovog ravnotežnog rastvora koncentracije (C_e , mg/l). Adsorpcioni kapacitet, najvažnija karakteristika efikasnosti adsorbenta, izračunava se iz **jednačine 1.10** na osnovu poznatih vrednosti početne i ravnotežne koncentracije adsorbata u rastvoru:

$$q_e = \frac{V(C_i - C_e)}{W} \quad (1.10)$$

gde je V zapremina rastvora (l), C_i i C_e su početna i ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/l), redom, i W je masa suve materije adsorbenta (g) [21].

Količina adsorbovane materije se izražava u procentima i izračunava na osnovu početne i ravnotežne koncentracije adsorbata u rastvoru primenom sledeće jednačine:

$$\text{uklanjanje boje (\%)} = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \times 100 \quad (1.11)$$

Adsorpcione izoterme su od velikog značaja za objašnjenje na koji način adsorbent interaguje sa adsorbatom, pa samim tim imaju važnu ulogu u razumevanju adsorpcionih mehanizama. U literaturi predstavljeno je nekoliko modela adsorpcionih izoterma, među kojima su najpoznatiji i najčešće korišćeni: Lengmirov (*Langmuir*), Frojndlihov (*Freundlich*), Tempkinov (*Tempkin*) i Dubinin-Raduškevičov (*Dubinin and Radushkevich*) model. Koji od modela će bolje opisati adsorpcioni proces određuje se na osnovu vrednosti koeficijenta korelacije linearne regresije R^2 . Odnos između ravnotežnih podataka i teorijskih ili praktičnih jednačina je od suštinskog značaja za tumačenje i predviđanje obima adsorpcije [12, 13, 30, 35].

1.6.1. Lengmirov model adsorpcione izoterme

Najčešće korišćen model adsorpcione izoterme je Lengmirov (*Langmuir*) model, koji se jednostavno izvodi iz zakona površina i glasi:

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1.12)$$

gde su: q_e (mg/g) količina adsorbovane rastvorene supstance u ravnotežnom vremenu, C_e (mg/l) ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru, K (l/mg) je Lengmirova izotermna konstanta i direktna mera intenziteta adsorpcije, a q_m maksimalni adsorpcioni kapacitet (mg/g). Lengmirovom izotermom se pretpostavlja homogena priroda površine adsorbenta (identična i energetski jednaka sorpciona mesta koja su dostupna i ograničenog su broja) i nekooperativno ponašanje tokom adsorpcije (monoslojna adsorpcija). Očigledno je da će adsorpcija, primenom alternativnih adsorbenta, retko zadovoljiti ove uslove [13].

Linearni oblik Lengmirove izoterme može biti napisan u dva različita oblika. Prvi linearni oblik nazvan je Lengmirov-1 model adsorpcione izoterme i glasi:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{K_L q_m} \quad (1.13)$$

Iz grafika linearne zavisnosti C_e/q_e od C_e mogu se izračunati, iz nagiba q_m , a iz odsečka K_L .

Drugi linearni oblik je nazvan Lengmirov-2 model adsorpcione izoterme i glasi:

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{K_L q_m} \right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (1.14)$$

Parametar q_m se računa iz nagiba, a K_L iz odsečka grafika funkcije zavisnosti $1/q_e$ od $1/C_e$ [30].

Faktor separacije, R_L se može izračunati na osnovu Lengmirovog grafika zavisnosti i to na osnovu sledećeg odnosa:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (1.15)$$

gde je R_L vrednost koja određuje tip adsorpcije, a C_0 je početna koncentracija adsorbata (mg/l). Ako je proces adsorpcije ireverzibilan (nepovratan), vrednost R_L je jednaka nuli. Kad su vrednosti R_L između nule i jedinice, onda je adsorpcija povoljna ili nepovoljna kada

je vrednost ovog faktora veća od jedan. Adsorpcija je linearna kada je R_L jednak jedinici [30].

1.6.2. Frojndlihov model adsorpcione izoterme

Frojndlihov (*Freundlich*) model adsorpcione izoterme je još jedna od najprimenjenijih jednačina koja se koristi za opis adsorpcione ravnoteže:

$$q_e = K_F c_e^{\frac{1}{n}} \quad (1.16)$$

gde su K_F i $1/n$ parametri Frojndlihove izoterme. Ovim adsorpcionim modelom izoterme se opisuje heterogenost sistema (smatra da je površina adsorbenta heterogena i da poseduje nejednako dostupna mesta sa različitim energijama i afinitetima na svojoj površini) i reverzibilna adsorpcija, koja nije ograničena monoslojnim formacijama. Linearni oblik Frojndlihove izoterme se može prikazati sledećom jednačinom [30, 35]:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} (\log C_e) \quad (1.17)$$

gde su: q_e (mg/g) je količina adsorbovane rastvorene supstance u ravnotežnom vremenu, C_e ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/l), K_F je Frojndlihoa konstanta vezana za adsorpcioni kapacitet adsorbenta, a n je Frojndlihoa konstanta vezana za verifikaciju vrste adsorpcije. Povoljnost adsorpcije ovog adsorpcionog modela može se odrediti iz Frojndlihovih konstanti. Kada K_F ima veće vrednosti tada su i veće vrednosti adsorpcionih kapaciteta. Kada je $n > 1$ favorizovana je adsorpcija adsorbata na adsorbentu, dok kada je $n < 1$, tada je proces adsorpcije hemijske prirode. Iz grafika zavisnosti $\log q_e$ od $\log C_e$ se mogu odrediti Frojndlihove konstante, iz nagiba konstanta n , a iz odsečka konstanta K_F [37].

1.6.3. Lengmir-Frojndlihov model adsorpcione izoterme

Iako se najčešće koriste Lengmirova i Frojndlihoa izoterma da opišu adsorpciono ponašanje rastvorene supstance u realnim sistemima, ipak one nisu uvek dovoljno dobre, posebno kada se koriste alternativni adsorbenti, zbog njihove veoma heterogene prirode.

U vezi s tim, Lengmir-Frojndlihova izoterma se često koristi da objasni adsorpcione procese u hemiji životne sredine [13]:

$$q_e = \frac{q_m K C_e^m}{1 + K C_e^m} \quad (1.18)$$

gde su q_m , K i m parametri izoterme. q_m (mg/g) je maksimalni adsorpcioni kapacitet pri zadatim uslovima; m je parametar heterogenosti i odražava različitu vrstu neidealnog ponašanja koje se može pojaviti u toku adsorpcije na različitim površinama. Adsorpciona ravnoteža na heterogenim površinama se može tretirati uz pomoću generalizovanih multisajtnih Lengmirovih (ili Lengmir-Frojndlihovih) izoterma. Ovaj pristup uzima u obzir nekoliko vrsta aktivnih mesta na površini adsorbenta, što odgovara originalnom Lengmirovom konceptu. Multisajtna Lengmirova izoterma se može napisati u sledećem obliku [13]:

$$q_e = \sum_{i=1}^n \frac{q_{m,i} K_i C_e}{1 + K_i C_e} \quad (1.19)$$

U većini slučajeva, dvo-sajtni modeli su dali zadovoljavajuće rezultate kod eksperimentalnih podataka, dok su značajna poboljšanja postignuta kada se koriste tri-sajtni ili čak složeniji modeli [13].

1.6.4. Tempkinov model adsorpcione izoterme

Tempkinovom (*Tempkin*) izotermom se pretpostavlja da se toplota adsorpcije svih molekula linearno smanjuje sa pokrivenošću površine zbog toga što dolazi do indirektnih interakcija između adsorbata i adsorbenta u adsorpcionom sloju. Ove interakcije imaju značajan uticaj na ravnotežu adsorpcije, a samu adsorpciju karakteriše uniformna distribucija vezujućih energija do neke maksimalne vezujuće energije [38]. Linearni oblik Tempkinove izoterme je dat sledećom jednačinom:

$$q_e = k_{1T} \ln k_{2T} + k_{1T} \ln C_e \quad (1.20)$$

gde su: q_e (mg/g) količina adsorbovane boje pri ravnoteži, C_e (mg/l) ravnotežna koncentracija tečne faze, k_{1T} je konstanta energije i k_{2T} (l/mg) je Tempkinova ravnotežna vezujuća konstanta koja odgovara maksimalnoj vezujućoj energiji.

Konstanta energije k_{1T} se može napisati i u sledećem obliku:

$$k_{1T} = \frac{RT}{b_T} \quad (1.21)$$

gde je R univerzalna gasna konstanta (8.314J/mol·K), T je apsolutna temperatura (K) i b_T Tempkinova energetska konstanta (J/mol) [39]. Iz grafika zavisnosti $\ln C_e$ od q_e se izračunavaju konstante i to, k_{1T} iz nagiba, a k_{2T} iz odsečka.

1.6.5. Dubinin-Raduškevičov model adsorpcione izoterme

Dubinin-Raduškevičova (*Dubinin and Radushkevich*) adsorpciona izoterma opisuje adsorpcioni mehanizam sa raspodelom Gausove (*Gauss*) energije na heterogenoj površini [40, 41]. Linearni oblik ove izoterme predstavljen je **jednačinom 1.22**:

$$\ln q_e = \ln q_s - B\varepsilon^2 \quad (1.22)$$

gde su q_s teorijski kapacitet zasićenja monosloja (mg/g), a B Dubinin-Raduškevičeva konstanta (mol^2/kJ^2). Planijev (*Polanyi*) adsorpcioni potencijal (ε) može se izračunati na sledeći način:

$$\varepsilon = RT \ln \left[1 + \frac{1}{C_e} \right] \quad (1.23)$$

Srednja sorpciona energija, E (kJ/mol) pruža informacije o hemijskoj i fizičkoj prirodi adsorpcije i povezana je sa konstantom B [40]:

$$E = \frac{1}{\sqrt{2B}} \quad (1.24)$$

1.7. Vrste adsorbenata

Materijal koji se koristi kao adsorbent za izdvajanje rastvorene supstance iz vodenog rastvora, može biti: sintetičkog porekla, prirodnog ili je rezultat industrijske proizvodnje. Opšta podela adsorbenata može biti izvršenai na: komercijalne (skupe) i alternativne (jeftine) adsorbente. Ipak, zajednička karakteristika svakog adosrbenta jeta da zahteva regeneraciju nakon upotrebe u cilju ponovne primene. Postoje različite metode regeneracije, kao što su termalna, hemijska, oksidaciona ili elektrohemijska. Poželjno je da se regeneracija odvija na efikasan način, bez oštećenja adsorpcionih i mehaničkih

karakteristika adsorbenta. Takođe, sirovine i postupci za dobijanje regenerisanih adsorbenata bi konačno trebalo da budu isplative, što dalje omogućava procesu adsorpcije, ekonomski uspešno takmičenje sa drugim alternativnim procesima izdvajanja [27, 31].

1.7.1. Komercijalni adsorbenti

Sintetisani ili komercijalni adsorbenti predstavljaju adsorbente sa najvećim adsorpcionim kapacitetima za uklanjanje različitih vrsta adsorbata. Čestice sintetisanih adsorbenata se odlikuju i daleko većom unutrašnjom od njihove spoljašnje površine. Tokom njihove proizvodnje, veoma su strogi uslovi kontrole kvaliteta. Ovakvom proizvodnjom se postiže da svaki adsorbent, unutar iste grupe, pokazuje gotovo uniformne osobine. Samim tim, njihova proizvodnja iziskuje i velike troškove [25, 27].

1.7.1.1. Aktivni ugalj

Među svim poznatim komercijalnim adsorbentima, komercijalni aktivni ugalj (KAU) je nesumnjivo najpopularniji i najefikasniji za izdvajanje adsorbata iz vodenih rastvora. Ukupna adsorpciona površina KAU se kreće od 500 do 2000 m²/g, a adsorpcioni kapacitet dostiže vrednosti i do oko 1000 mg/g, i zavise od izvora sirovina, uslova pripreme i tretmana. Hemijska priroda KAU je takva da omogućava laku modifikaciju površine u cilju poboljšanja njegovih adsorpcionih karakteristika [12, 26, 27, 29].

Gotovo bilo koji ugljenični materijal može biti prekursor za dobijanje KAU različitim procesima fizičke i hemijske aktivacije. Fizička aktivacija zahteva visoku temperaturu i duže trajanje procesa u poređenju sa hemijskom aktivacijom, koja zahteva ispiranje AU zbog upotrebe hemijskih agenata tokom aktivacije. Najčešće korišćeni prekursori za proizvodnju KAU su antracit, bitumenski ugalj, lignit i drvo, jer su lako dostupni i imaju nisku cenu. Danas se nude i drugi dodatni izvori kao što su: otpadna biomasa (poljoprivredni nus-proizvodi i otpad iz šumske industrije) i drugi otpadni materijali (industrijski nus-proizvodi i komunalni otpad). Ekonomska vrednost ovih otpadnih materijala je veoma mala ili čak nikakva, a pritom često predstavljaju i veliki problem odlaganja. Njihovom konverzijom u AU dobija se na njihovoj ekonomskoj vrednosti, a ujedno se smanjuju troškovi njihovog trajnog odlaganja. Sa stanovišta

kontrole zagađenja, upotreba KAU zasnovana na relativno skupim polaznim materijalima, takođe je neopravdana [26, 27, 29].

Nedostaci u primeni KAU kao adsorbenta su: veoma visoka cena, veći kvalitet zahteva i veći trošak, neselektivnost, kao i neefikasnost prema nekim hemijskim vrstama, na primer, prema disperznim i vat bojama. Nakon upotrebe, postaje istrošen i nije više sposoban za dalju adsorpciju, pa se mora regenerisati. Proces regeneracije je skup, nije jednostavan i rezultira u gubitku i smanjenju adsorpcionih karakteristika adsorbenta [12, 29].

1.7.1.2. Polimerni adsorbenti

Polimerni adsorbenti ili adsorpcione smole nastaju kopolimerizacijom stirena ili estra akrilne kiseline sa divinilbenzenom (sredstvom za unakrsno povezivanje). Površina smola je relativno homogena i kreće se do 800 m²/g. Sa povećanjem stepena umrežavanja, veličina pora postaje manja, a površina veća. Visoko umreženi polimerni adsorbenti pokazuju adsorpcione kapacitete koji su uporedivi sa KAU, najčešće su dostupni u obliku perlica (Ø 0.5 mm). Troškovi regeneracije su veći nego kod regeneracije KAU [27, 31].

1.7.1.3. Oksidni adsorbenti

Oksidni adsorbenti obuhvataju čvrste hidrokside, hidratizane okside i okside. Nastaju taloženjem hidroksida koje je praćeno delimičnom dehidratacijom na povišenim temperaturama. Hidroksidni proizvodi su termodinamički metastabilni i daljim zagrevanjem dolazi do njihove transformacije u stabilne okside. Najvažniji među njima su aluminijum oksidi (Al₂O₃·nH₂O), sintetisani kristalni gel koji je dostupan u obliku granula različitih veličina. Adsorpciona površina se kreće od 150-350 m²/g i polarnija je u odnosu na površinu silika gela. Mogu ispoljavati karakteristike i baza i kiselina. [12, 25, 27].

1.7.1.4. Silika gel

Silika gel, nastaje koagulacijom koloidnih kiselina silicijuma formirajući porozne i nanokristalne granule različitih veličina. Postoje tri tipa silika gela: normalne (do 900

m²/g), srednje (300-350 m²/g) i male (100-200 m²/g) gustine. Smatraju se dobrim, ali i skupim adsorbentima koji se koriste u mnogim industrijama [12, 25].

1.7.1.5. Sintetički zeolit

Komercijalno dostupni sintetički zeoliti se proizvode nizom koraka: sinteza, peletizacija i kalcinacija. Sinteza se odvija iz alkalnih vodenih rastvora jedinjenja silicijuma i aluminijuma pod hidrotermalnim uslovima. Mogu se razlikovati različite klase sintetisanih zeolita u zavisnosti od odnosa SiO₂/Al₂O₃ (n), koji može ići i do brojke 1000. Dobro poznati primeri su tip A (n= 1.5 ... 2.5), tip X (n=2.2 ... 3.0) i tip Y (n=3.0 ... 6.0). Njihova jonska priroda je takva da imaju visok afinitet za vodu i druge polarne molekule. Hidrofobnost sintetisanih zeolita raste sa povećanjem odnosa SiO₂/Al₂O₃. Sintetički zeoliti, sa n>10, su još hidrofobniji i predstavljaju potencijalne adsorbente za organska jedinjenja. Poznato je više od 150 tipova sintetičkih zeolita, ali među njima, najvažniji su sintetički tipovi A i X, sintetički mordenit i njegove jonoizmenjivačke varijante [27, 29, 31].

1.7.2. Alternativni adsorbenti

Alternativnim ili jeftinim adsorbentima se nazivaju oni materijali koji imaju malu ili gotovo nemaju nikakvu ekonomsku vrednost, koji se nalaze u velikim količinama, mogu se upotrebiti kao adsorbenti bez ikakve ili sa minimalnom obradom i ne zahtevaju dodatne troškove odlaganja. Na osnovu njihove dostupnosti, alternativni adsorbenti se mogu klasifikovati u tri grupe: prirodni materijali, industrijski/agroindustrijski/komunalni čvrst otpad ili nus-proizvodi i sintetisani proizvodi. Drugi način klasifikacije na osnovu njihove prirode, alternativne adsorbente svrstava u dve grupe: neorganske i organske adsorbente [12].

Poslednjih godina, primena adsorbenata biološkog porekla postala je veoma interesantna i privlačna oblast istraživanja. U tom slučaju adsorbenti se nazivaju biosorbentima, a sam proces adsorpcije adsorbata, biosorpcijom. Treba praviti razliku između biosorpcije i bioakumulacije. Biosorpcija je pasivan proces vezivanja hemijskih vrsta primenom biomase koja nije živa, dok je bioakumulacija jedan kompleksniji proces zasnovan na metaboličkom aktivnom transportu unutar živih organizama [13, 29].

Biosorbenti i njihovi derivati sadrže različite funkcionalne grupe na svojoj površini (karboksilne, sulfatne, amino, hidroksilne i druge), koje mogu vezati kompleksne molekule adsorbata. Adsorpcioni kapaciteti biosorbentata su dosta niži u poređenju sa skupim komercijalnim adsorbentima. U poređenju sa KAU ili jonoizmenjivačkim smolama, biosorbenti su često mnogo specifičniji. Takođe, adsorpcione osobine biosorbentata su podložnije većim varijacijama u poređenju sa komercijalnim adsorbentima. Međutim, najvažnija tačka pri razmatranju njihovog izbora i primene, je pre svega cena [26, 27].

Dakle, biosorpcija je jedna nastajuća tehnologija koja pokušava da prevaziđe nedostatak selektivnosti komercijalnih adsorpcionih procesa. Primena biosorbentata, u cilju koncentrisanja i izdvajanja hemijskih vrsta iz vodenih rastvora, je relativno novi pristup, koji je konkurentan, efikasan i jeftin. Na primer, poslednjih godina razvile su se različite metode za prečišćavanje otpadnih voda koje uključuju ekonomične i efikasne biosorbente, koji mogu smanjiti koncentraciju boje do nivoa u ppm-ovima [28, 29]. Takođe, treba uzeti u obzir i druge ekonomske aspekte kod primene alternativnih adsorbentata, kao što su: troškovi transporta, predtretmana, regenerisanja i odlaganja potrošenih adsorbentata. Zatim, treba uzeti u obzir i tehničke aspekte koji obuhvataju: dostupnost u dovoljnim količinama i stabilan kvalitet, fizičko-hemijske karakteristike i homogenost, hemijsku stabilnost pri zadatim uslovima rada, trajnost tokom procesa adsorpcije, mogućnost regenerisanja, selektivnost i otpornost prema drugim supstancama prisutnim u smeši vodenog rastvora koje nisu adsorbat [13].

1.7.2.1. Prirodni materijali

1.7.2.1.1. Ugalj

Prirodni ugalj je mešavina ugljeničnih i mineralnih materijala, nastalih razgradnjom biljaka. Pošto ugalj nije čist materijal, samim tim poseduje različite osobine površine. Adsorpcione karakteristike svake pojedinačne vrste uglja zavise od prirode polazne vegetacije i obima fizičko-hemijskih promena koje su nastale nakon deponovanja, kao i od fizičkih i hemijskih tretmana pre upotrebe [12, 26].

1.7.2.1.2. Glina

Glina, kao i zeolit, može biti prirodna ili sintetička. Predstavlja hidrirani alumosilikat koji se definiše kao mineral koga čine koloidne frakcije ($< 2\mu\text{m}$) zemljišta, sedimenata, stena i vode. Može biti mešavina sitnozrnih minerala gline i gline veličine kristala drugih minerala, kao što su kvarc, karbonat i metalni oksidi. Kod procesa adsorpcije uglavnom dominira proces jonske izmene, jer na svojoj površini glina sadrži zamenljive jone. Zbog ovakve svoje sposobnosti, glina igra važnu ulogu u životnoj sredini kao prirodni čistač ili sakupljač zagađivača [26, 31]. Adsorpciona površina se kreće do $800\text{ m}^2/\text{g}$, dok adsorpcioni kapacitet veoma varira sa promenama pH. Struktura gline je slojevita i na osnovu razlika u slojevitosti strukture, izvršena je podela na klase, među kojima su: smektiti, iliti, kaoliniti, serpentiniti, talk, vermikuliti i sepioliti [12, 13, 26, 29].

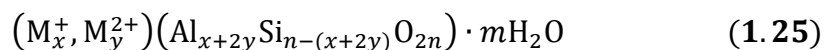
1.7.2.1.3. Silikatni materijali

Prirodni silikatni materijali, kao što su silicijumske perle, alunit, dolomit i perlit, koriste se sve više kao adsorbenti. Najveću pažnju privlače silicijumske perlice zbog svoje hemijske reaktivnosti hidrofilne površine, porozne teksture, mehaničke stabilnosti i velike adsorpcione površine. Na svojoj površini, među mnogim grupama, poseduju silanolnu grupu koja uzrokuje jake i često nepovratne nespecifične adsorpcije. Iz tih razloga, neophodno je da se uklone ove negativne osobine procesima modifikacije adsorbenata [30].

1.7.2.1.4. Zeolit

Prirodni zeolite su najporozniji kristalni hidratizirani alumosilikati (tektosilikati) čije strukture sadrže beskonačne trodimenzionalne okvire. Osnovu trodimenzionalne mreže čine tetraedarske grupe SiO_4 i AlO_4 . Susjedni tetraedri su vezani, na svojim uglovima, preko zajedničkog atoma kiseonika, čineći strukturu zeolita bogatom šupljinama i kanalima. Otvore kanala čini 6, 8, 10 ili 12 atoma kiseonika zajedno sa istim brojem atoma silicijuma i/ili aluminijuma. Zeoliti se mogu smatrati derivatima silikata, gde je silicijum delimično supstituisan aluminijumom. Kao posledica izostrukturne zamene četvorovalentnog silicijuma trovalentnim aluminijumom, okviri zeolita nose negativno naelektrisanje [26, 27,

29, 42]. Ovaj višak negativnog naelektrisanja je kompenzovan pozitivnim jednovalentnim i/ili dvovalentnim katjonima metala. Veličina kanala zavisi od broja atoma koji ga čine [24, 31, 43]. Odnos aluminijuma i silicijuma u prirodnom zeolitu je takav da sadržaj aluminijuma nikada ne prelazi sadržaj silicijuma. Zagrevanjem, voda se može reverzibilno ukloniti ostavljajući mikroporoznu strukturu. Opšta molekulska formula zeolita glasi:



gde su jednovalentni (M^+) i dvovalentni (M^{2+}) izmenljivi katjoni. Ostali elementi su strukturni, koji zajedno sa kiseonikom čine kristalnu rešetku zeolita. Zeolit poseduje tri osnovna svojstva: sorpciona, jonoizmenjivačka i katalitička. Visok jonoizmenjivački kapacitet i relativno visoka specifičnost površine, kao i relativno jeftina cena, čine prirodne zeolite privlačnim adsorbentom. Cenu svakako određuje kvalitet minerala. Površina zeolita je hidrofilna jer sadrži hidratizane neorganske katjone, pa iz tih razloga ne pokazuje afinitet prema hidrofobnim slabo polarnim organskim molekulima. Njegovom površinskom modifikacijom mogli bi se ukloniti ovi nedostaci [24, 29, 42].

Među prirodnim zeolitima, čiji spektar obuhvata preko četrdeset vrsta, najčešće je proučavan klinoptilolit. Pripada grupi zeolita heulandiskog tipa (hejlanditskog tipa). Brojne studije su potvrdile sposobnost klinoptilolita u izdvajanju različitih vrsta adsorbata iz vodenog rastvora. Jedan od nedostataka je njegova slaba propustljivost kad se koristi u kolonama, pa zahteva veštačku podršku [13, 25, 29, 30].

1.7.2.1.5. Treset

Treset je porozan, prilično složen i lako dostupan prirodni materijal zemljišta sa organskom materijom u različitim fazama raspadanja. Na osnovu prirode polaznog materijala, treset se klasifikuje u četiri grupe: treset mahovina, zeljasti treset, drveni treset i sedimentni treset. Sirovi treset sadrži još i lignin, celulozu, fulvinske i huminske kiseline, a sadržaj ugljenika se kreće oko 50 %. Primena sirovog treseta kao adsorbenta ima niz ograničenja: mala mehanička čvrstoća, veliki afinitet za vodu, lošu hemijsku stabilnost, luči fulvinske kiseline i ima tendenciju da se skupi i/ili deformiše. Hemijskim predtretmanima i imobilizacijom biomase, mogu se prevazići neki od problema i poboljšati adsorpcione

karakteristike. Adsorpcija katjonskih vrsta pretežno je praćena hemisorpcijom, dok se adsorpcija anjonskih vrsta, uglavnom ostvaruje fiziosorpcijom [12, 13, 29].

1.7.2.2. *Industrijski i komunalni nus-proizvodi/ćvrst otpad*

U proizvodnim procesima mnogih industrija, nastaju velike kolićine razlićitog ćvrstog otpadanog materijala kao nus-proizvoda. Neki od ovih materijala se uklanjaju iz proizvodnog procesa kao ćvrst otpad jer nemaju nikakvu dalju primenu i odlaću se na neko drugo mesto, dok se pak drugi materijali mogu staviti u dalju primenu i kao takvi bi ovi nus-proizvodi mogli imati i znaćajnu trţišnu vrednost, jer u sebi sadrţe skriveno upotrebljive supstance. Generalno industrijski otpadni materijali su dostupni gotovo besplatno, a najveći problemi sa kojima se susreće većina industrijskih pogona je njihovo odlaganje. Ukoliko se ćvrst otpad moţe upotrebiti kao jeftini adsorbent, on moţe obezbediti dvostruku prednost u cilju smanjenja zagaćenja životne sredine. Prvo, dolazi do smanjenja obima otpadnog materijala koji se odlaće, a drugo je smanjenje cene prećišćavanja otpadnih voda. S obzirom da je reć o primeni jeftinih adsorbenata, ne bi bila potrebna regeneracija ovakvog utrošenog materijala. U vezi s tim, raznovrsni industrijski otpad je ispitivan kao potencijalni adsorbent za uklanjanje razlićitih vrsta adsorbata iz vodenih rastvora sa ili bez nekog predtretmana [12, 25, 29].

1.7.2.2.1. *Pepeo*

Pepeo je glavni nus-proizvod termoelektrana i brojnih procesa sagorevanja, ćija je proizvodnja u svetu oko $67,5 \times 10^6$ t/god i generalno je dostupan bez nadoknade. Glavna upotreba pepela je u izgradnji puteva, cigle i cementa. Ćesto moţe da sadrţi neke opasne supstance, kao što su teški metali. Sa druge strane, pepeo iz industrije prerade šećerne trske, industrije uljane palmice i pirinćanih mlinova, ne sadrţi velike kolićine toksićnih supstanci. Adsorpciona površina ćestica pepela kreće oko $15,6 \text{ m}^2/\text{g}$, ali pak osobine pepela veoma variraju i jako su zavisne od izvora [12, 25, 29, 30].

Pepeo od uglja se sastoji od silicijum dioksida (SiO_2), aluminijum trioksida (Al_2O_3) i oksida gvoţđa, sa razlićitim sadrţajem ugljenika, kalcijuma, magnezijuma i sumpora. Kod sagorevanja uglja, razlikuju se dve opšte klase pepela: klasa F i klasa C. Klasa F se

normalno proizvodi od antracita, bitumenoznog ili subbitumenoznog uglja i sadrži manje od 7 % kalcijum oksida (CaO). Dok se klasa C proizvodi od lignita uglja, sa sadržajem kalcijum oksida od 5 do 30 %. Pepeo ima hidrofilnu površinu i poroznu strukturu. Nesagoreli ugljenik ima značajnu ulogu u izdvajanju manje polarnih jedinjenja, ali i jonskih vrsta na površini čestica pepela. Takođe, različitim tretmanima sumpornom kiselinom, ultrazvučnim talasima, mikrotalasnim zračenjem i vodonik-peroksidom, raste specifična površina pepela i adsorpcioni kapacitet za katjonske adsorbate [13, 44].

1.7.2.2.2. Otpad/nus-proizvodi iz industrije prerade drveta i papira

Iz industrije prerade drveta, piljevina (strugotine) i kora su dva najobilnija nus-proizvoda. Pokazali su se kao efikasni biosorbenti, gde se posebno izdvaja adsorpcioni kapacitet piljevine, koji može da varira u opsegu od 3,42-398,80 mg/g u zavisnosti od vrste izvora. Sadrže različite organske materije (lignin, celulozu i hemicelulozu) sa polifenolnim grupama, koje mogu biti korisne za vezivanje različitih adsorbata različitim mehanizmima. Jedan od problema kod njihove primene je da su biosorpcije jako pH-zavisne, kao i prisutni troškovi transporta do skladišta odakle će se dalje koristiti [12, 29].

U papirnoj industriji se proizvodi velika količina nus-proizvoda kao što su: takozvana crna tečnost i papirni mulj, koji su takođe testirani kao alternativni adsorbenti. Na primer, papirni mulj se pokazao kao dobar adsorbent za anjonske boje [25].

Komunalni celulozni otpadni materijal, kao što su novine, beli karton, beli papir sveski, papir za štampanje i fotokopiranje, testirani su takođe za adsorpciju različitih vrsta adsorbata. Korišćenje ili u nativnom obliku ili je poslužio kao predkursor za dobijanje KAU. U oba slučaja pokazao se kao pogodan adsorbent za adsorpciju katjonskih vrsta [45].

1.7.2.3. *Agroindustrijski nus-proizvodi*

U agroindustriji nastaje velika količina različitih otpadnih materijala biljnog i životinjskog porekla (preko 320×10^9 t/god). Otpad iz ovih industrija je okarakterisan kao visoko specifičan, čije je korišćenje i odlaganje teško zbog njegove neadekvatne biološke stabilnosti, potencijalne patogene kontaminacije, visokog sadržaja vode, visokog potencijala autooksidacije i visokog nivoa enzimske aktivnosti. Sastoji se uglavnom od

organskih ostataka određenih sirovina čiji se sastav veoma retko menja kako bi kvalitet proizvoda ostao dosledan. Upravljanjem agroindustrijskim otpadnim materijalima promoviše održiv razvoj zemlje u pogledu njene ekonomije i zaštite životne sredine. Valorizacija i potpuno iskorišćenje biomase nus-proizvoda, čvrstog otpada i otpadnih voda se postiže primenom nekih od hemijskih, fizičkih i biotehnoških procesa. Na taj način se omogućava ponovno iskorišćenje bioaktivnih i visoko vrednih komponenti (antioksidansi, vitamini, pigmenti, dijetetska vlakna, pektin, oligosaharidi i drugi) koje su veoma značajne za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju [12-14, 46].

Agroindustrijski nus-prizvod je najčešće korišćena sirovina za razvoj jeftinih adsorbenata koji bi zamenili skup KAU u njegovoj primeni. Mnoge vrste su testirane za biosorpciju različitih adsorbata iz vodenih rastvora. Ovakav sirov materijal poseduje niz fizičko-hemijskih karakteristika koje mu daju mogućnost korišćenja kao sorbenta, čak i bez dodatnih predtretmana. Samo odabranim i pogodnim predtretmanima se mogu povećati sorpcione karakteristike ovih materijala. Pored hemijskih predtretmana primenom različitih agenasa, najčešće se otpadni materijal suši i mehanički melje do veličine čestica piljevine ili praha pre upotrebe [12, 13, 26]. Neki od najčešće korišćenih nus-proizvoda agroindustrije u istraživanjima razvoja alternativnih adsorbenata su: listovi (guava, nim, zeleni, crni i drugi čajevi), slama (pšenica, pirinač), ljuske (kikiriki, kokos, badem, lešnik, topola, orah), ljuspice (ječam, pšenica, pirinač, kafa), semena (pšenica, papaja, mango, kafa), kore (narandža i drugo citrusno voće, banana, grožđe, kelerabe, masline, bundeva, jabuka), vlakna (palma, pamuk), pulpa (urme, bezuljne soje, šećerna repa), klip (kukuruz), stabljike (šećerne trske, bambusa, suncokreta, grožđe) i drugi [12, 26, 29, 47-49].

1.7.2.3.1. Otpadna mikrobna biomasa

U procesima fermentacije, za potrebe sinteze vrednih proizvoda kao što su antibiotici i enzimi, nastaje velika količina otpadne mikrobne biomase (alge, kvasci, bakterije i gljive). Ona je, zbog svojih fizičko-hemijskih predispozicija, sposobna da ukloni širok spektar različitih adsorbata i to sa visokom efikasnošću. Ipak, uprkos dobrim adsorpcionim karakteristikama i visokoj selektivnosti, njena upotreba kao adsorbenta, ima i neka ograničenja. Adsorpcioni procesi su često veoma spori. Na primer, adsorpciona

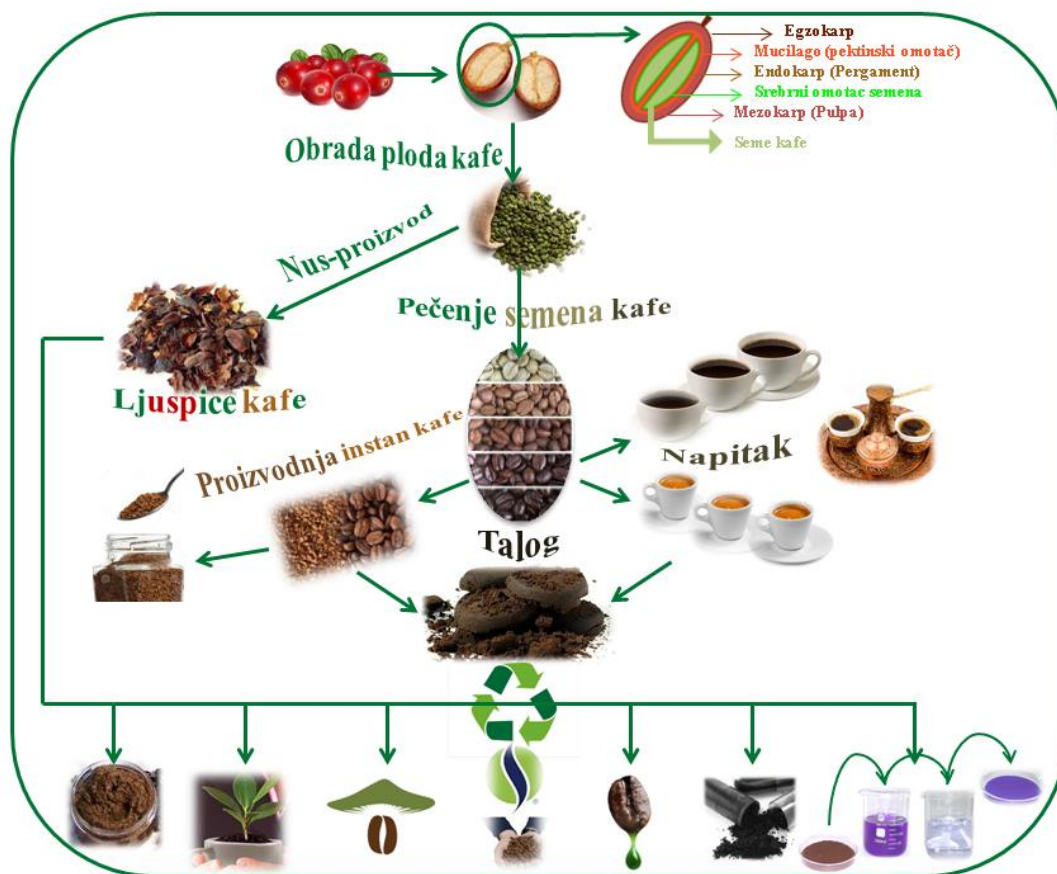
ravnoteža za sintetičke boje se postiže nakon 42 h (*Aspergillus niger*). Zatim, tu su i uslovi početne pH u vodenom rastvoru, specifične osobine površine biomase, kao i spoljašnji faktori (soli i joni) koji mogu biti konkurenti sa molekulima adsorbata. Takođe, nije pogodna za primenu u kolonskoj biosorpciji zbog pojave začepljenja [29].

1.7.2.3.2. Otpadna kafa

Kafa se uzgaja u oko 60 država širom sveta, pre svega u tropskim i subtropskim oblastima. Najveći proizvođač je Brazil, sa proizvodnjom od oko $6,6 \times 10^6$ t/god. Posle proizvodnje nafte, smatra se da je kafa druga po redu najvažnija proizvedena roba u svetu. Ekonomski značaj kafe potiče zbog pravljenja napitka od prženih semena biljke kafe. Ovaj napitak je veoma popularan i stimulišući, zbog prisustva kofeina, u mnogim delovima sveta. Većina napitaka od kafe se priprema od mešavine dve vrste: *Coffea arabica* (Arabika) i *Coffea canephora* (Robusta) [14, 50].

Više od 50 % ploda kafe se ne koristi u proizvodnji komercijane sirove zelene kafe. Tokom procesa prerade u prehrambenoj industriji, nastaju velike količine nus-proizvoda, ljušpice od kafe, čiji sastav varira u zavisnosti od načine obrade. Nus-proizvod suve prerade predstavlja frakciju koju čine: spoljašnje opne bobice kafe (egzokarp), pulpa (mezokarp), sluz (pektinski omotač) i pergament (jak vlaknast endokarp). Ovaj otpadni materijal bogat je ugljenim hidratima (35 %), proteinima (5,2 %), vlaknima (30,8 %) i mineralima (10,7 %). Tokom vlažne obrade kafe, nastaje malo drugačiji nus-proizvod jer pritiskom plodova kafe u vodi deo mezokarpa, sluzi i endokarpa ostaje i dalje vezan za semena kafe. U ovom slučaju se mogu razlikovati tri frakcije: najveću čine egzokarp i mezokarp (43,2 % suve materije cele voćke); drugu, kada se ne primenjuje fermentacija, čine mucilago i rastvorni šećeri (11,8 %) i treća je endokarp ploda kafe (6,1 %). Prvu frakciju čine ugljeni hidrati (21-32 %), proteini (7,5-15 %) i masti (2,0-7,0 %). Sluz koja ostaje da prijanja za seme kafe, sačinjena je od vode (84,2 %), proteina (8,9 %), šećera (4,1 %), pektinskih materija (0,91 %) i pepela (0,7 %). Što se tiče treće frakcije, endokarpa koji pokriva obe hemisfere semena ploda kafe i odvaja ih međusobno, uklanja se nakon sušenja u odvojenim koracima. Na ovaj način pergament se prikuplja i koristi odvojeno od ostalih nus-proizvoda. Sačinjen je od (α -) celuloze (40-49 %), hemiceluloze (25-32 %), lignina (33-

35 %) i pepela (0,5-1 %). Srebrni omotač semena kafe ostaje nakon obrade na sirovoj zelenoj kafi i uklanja se nakon pečenja zrna kafe. Na godišnjem nivou, pored ovih nus-proizvoda, nastaju i velike količine čvrstog otpada tokom industrijske proizvodnje instant kafe kao i napitaka od kafe u ugostiteljskim objektima (restorani i kafeterije) i koji je nazvan talog od kafe ili otpadna kafa (Slika1.2.) [50, 51].



Slika 1.2. Obrada ploda kafe i iskorišćenje nastalih nus-proizvoda od kafe

Postoji niz problema vezanih za zbrinjavanje ove vrste otpadnog materijala u smislu njegovog adekvatog odlaganja. Visoki sadržaj vlage (~50 %) i hemijski sastav ograničava njegovu dalju primenu kao izvora goriva ili kao komposta ili kao stočne hrane. Direktna upotreba u vidu stočne hrane je nemoguća zbog antifiziološki antinutritivnih faktora (prisustvo tanina i kofeina). Većina otpadnog taloga od kafe se spaljuje, što naravno doprinosi proizvodnji ugljen dioksida, glavnog gasa efekta staklene bašte. U vezi s tim,

neophodno je razviti nove tehnologije koje omogućavaju ponovnu upotrebu ovog otpadnog materijala pretvarajući ga u jedan novi resurs (**Slika 1.2.**) [14, 50, 51].

Otpadna kafa može da posluži kao sirovina za različite proizvode jer su i nakon prerade mnoge hemijske komponente sačuvane u materijalu i mogu biti dragoceni resurs u prehrambenoj, farmakološkoj i kozmetičkoj industriji. Otpadni srebrni omotačima ima visok sadržaj melanoidina nastalih tokom prženja, a nizak sadržaj slobodnih jedinjenja fenola, čineći ga funkcionalnim sastojkom u prehrambenoj industriji. Nus-proizvodi prerade kafe mogu biti izvor fitohemikalija: četiri klase polifenola iz pulpe kafa Arabike (flavan-3-oli, hidrokisicinamična kiselina, flavonoli, antocijanidini) i fenolna jedinjenja (klorogena kiselina, epikatehin, katehin, rutin, protokatehulna kiselina, ferulna kiselina). Zatim, predložena je i nova procedura za ekstrakciju ulja iz otpadne kafe, koje se transesterifikacijom prevodi u biodizel (oko 15 % u zavisnosti od vrste kafe). Biodizel nastao ovim putem pokazao je stabilnost mesec dana tokom čuvanja na sobnoj temperaturi, a talog nakon ekstrakcije ulja, pogodan je da se dalje koristi kao đubrivo za vrt, sirovina za proizvodnju etanola ili peleta [14, 50].

Primena otpadne kafe kao adsorbenta je takođe jedna od najistraživanijih oblasti. Testirana je za izdvajanje različitih adsorbata iz vodenih rastvora: olovo, hrom i drugih jona teških metala, kao i mnogih vrsta sintetičkih boja. Pokušano je i sa mogućom proizvodnjom AU različitom obradom kao što su: karbonizacija u mikrotalasnoj pećnici i konvencijalni termički postupci u pećima (300 do 800 °C). U nekim slučajevima je pokazano da je AU, nastao od otpadne kafe, imao bolji afinitet za katjonske boje nego KAU. Takođe, zabeležena je i primena taloga od kafe bez ikakvih predtretmana kao adsorbenta (izdvajanje jona kadmijuma iz vodenih rastvora) [14, 51, 52].

1.7.2.3.3. Otpadna šećerna repa

Tokom industrijske proizvodnje šećera, obradom šećerne repe (*Beta vulgaris* L.), nastaje velika količina lignoceluloznog nus-proizvoda, nazvan otpadna šećerna repa ili repini rezanci (u Evropskoj zajednici oko 14×10^6 t/god). Osušeni nus-proizvod može biti u obliku granula (pelet, rezanci), smrvljena na krupnije komadiće (mrve li ljuspice) ili sitnije komadiće (trunke) (**Slika 1.3.**). Ovaj otpadni materijal je veoma jeftin (100

američkih dolara po toni materijala), i za razliku od otpadne kafe može da se koristi direktno kao stočna hrana preživara, što je i njegova glavna primena. Osim što predstavljaju hranu za životinje i za proizvodnju dijetetskih proizvoda, svoju primenu repini rezanci su pronašli i kao potencijalni biosorbenti [2, 19, 53, 54].



Slika 1.3. Obrada šećerne repe i iskorišćenje nus-proivoda od šećerne repe

Repini rezanci su prirodni polimer koji se sastoji od celuloze (27 %), hemiceluloze (29 %), pektinskih supstanci (29 %), proteina (5 %), nerastvornog pepela (4 %), lignina (3 %) i šećera (3 %). Ipak, glavne komponente su glukoza (većinom iz celuloze), arabinoza i galakturonska kiselina, pored sporednih: ramnoze, fruktoze, ksiloze, manoze, galaktoze, metanola, sirćetne kiseline i pepela. Ekstrakcijom, pektin bi se mogao koristiti u prehrambenoj industriji, a celuloza za dobijanje bioetanola. Pektinske supstance se javljaju kao poliuronidi, kao ravni lanci nekoliko stotina molekula α -D-galakturonske kiseline povezanih 1→4 glikozidnim vezama. U proseku, za njih su vezane α -L-ramnoza (1-4 %), a za ramnozu kovaletnom vezom L-arabinoza i *o*-galaktoza (10-15 %). Zbog sadržaja

karboksilnih funkcionalnih grupa galakturonske kiseline, pektinske supstance nude prednost u primeni repinih reznaca kao alternativnih adsorbenata za metalne katjone. Repini rezanci su pokazali dobre adsorpcione karakteristike naročito za Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} i Cr^{2-6+} [3, 20, 55]. Pored toga što imaju mogućnost uklanjanja jona metala pokazali su se i kao efikasan adsorbent prilikom uklanjanja boja iz vodenih rastvora kao što su Gemazol tirkizno plava-G (anjonska boja) i metilensko plava boja (katjonska boja) (**Slika 1.3.**) [20, 54]. Neki istraživači su posebno naglasili da karbonizacija repinih reznaca, tehnikama pirolize sa različitim hemikalijama, mogu dodatno povećati sorpcioni kapacitet i fizičku stabilnost nosača [18, 19].

2. Industrijske obojene otpadne vode

Industrijske otpadne vode su otpadne vode koje zaostaju posle tehnološkog procesa i ispuštaju se u životnu sredinu. Njihove karakteristike variraju od industrije do industrije, a kvalitet i kvantitet zavisi od prirode industrije, sirovina koje se koriste, proizvodnog procesa i načina upravljanja [56-58].

Poznato je da je percepcija javnosti o kvalitetu voda, pod velikim uticajem prisustva boje u njima. Obojenost otpadne vode je prvi znak koji ukazuje na kontaminaciju. Prisustvo čak i veoma male količine boje u vodi (< 1 ppm za pojedine boje) je nepoželjno, jer je vidljivo golim okom. Pojava obojenih otpadnih voda je posledica serije procesa, kako u proizvodnji samih boja, tako i industriji korisnika boja. Neke od industrija koje koriste boju za bojenje svojih proizvoda su: industrija tekstila, papira, plastike, premaza, fotografije u boji, kozmetike, lekova, kože, prehrambena i fotokatalitička industrija. Istovremeno, pored boje, tokom rada koriste i velike količine vode. Kao posledica nepravilne obrade i izbora metoda u proizvodnim procesima industrija i korišćenih tretmana u prečišćavanju obojenih otpadnih voda pre njihovog ispuštanja u životnu sredinu, u životnu sredinu oslobodi i do 10-15 % ukupne godišnje proizvedene boje u svetu. Izlivanje obojenih otpadnih voda u vodotokove, ne utiče negativno samo na njihov estetski izgled, već i na prodiranje svetlosti u njima. Dalje, to sprečava odvijanje fotosinteze i normalno funkcionisanje lanaca ishrane u njima, što za posledicu ima poremećaj distribucije (zoniranje) vodenih ekosistema [26, 48, 59-62].

Među svim ovim industrijama, najveći potrošač vode je tekstilna industrija, posebno u završnim koracima obrade tekstila (štampanje i bojenje). U proseku se potroši 100-150 m³/t proizvoda. Ona je i jedan od najvećih zagađivača životne sredine jer generiše velike količine otpadnih voda, od kojih čak oko 90 % zahteva obradu na kraju procesa. U Evropi se u tekstilnoj industriji proizvede oko 108×10^6 t/god otpadnih voda iz kojih se ukloni oko 36×10^6 t hemikalija i pomoćnih supstanci [13, 60, 61, 63, 64].

Otpadne vode tekstilne industrije su složene prirode. U njima se ne nalaze samo boje širokog spektra koje se nisu vezale za vlakno, već i pomoćne hemikalije za bojenje, soli, kiseline, baze, sapuni, deterdženti, hlorisana jedinjenja, a povremeno i teški metali.

Karakteriše ih i niska vrednost BPK, kao i visoka vrednost HPK. Generalno, ove otpadne vode karakteriše: umereni sadržaj organskih materija, niska biorazgradljivost (zbog takozvane tvrdoglave prirode mnogih boja), promenljiva vrednost pH (obično alkalna) i promenljiv sadržaj boje (kvalitativno i kvantitativno). Nakon procesa bojenja, vlakna se ispiraju, što doprinosi razređivanju boje u otpadnim vodama i otežava predviđanje prosečne koncentracije boje. U literaturi se navodi, da se koncentracija boje u otpadnim vodama kreće od 10 do 300 mg/l. Na osnovu svega gore navedenog, tekstilne otpadne vode se teško prečišćavaju i recikliraju. Cena prečišćavanja otpadnih voda varira u proseku od 0,5-2,5 €/m³ i očekuje se da će cena u budućnosti da raste (3-5 €/m³) [13, 48, 64, 65].

2.1. Boje

Boje ili sredstva za bojenje su obojena organska jedinjenja ili smeše koja apsorbuju svetlost u vidljivom delu spektra, talasne dužine od 400 do 700 nm. Imaju sposobnost bojenja različitih materijala, stvarajući sa njima hemijske veze ili se vezuju za njih fizičkim silama. Sve boje ne moraju nužno biti obojene supstance. U pojam boja mogu se uključiti i optički posvetljivači ili izbeljivači (takozvane bele boje). Boje su rastvorne u vodi i u obliku rastvora se primenjuju na supstrat (tkanina, papir, plastika, koža, ulja). Takođe, ni sve obojene supstance nisu boje. One koje nisu rastvorne u vodi ili u drugim rastvaračima se nazivaju pigmentima i upotrebljavaju se u formi paste [60].

Postoje prirodne i sintetičke boje. Prirodne boje se koriste od davnina, a veruje se da su Neandertalci bili ti koji su ih prvi koristili. Međutim, prva poznata upotreba organskih bojila bila je mnogo kasnije, pre oko 4000 godina, pošto je indigo plava pronađena u omotu mumije u egipatskim grobnicama. Do kraja XIX veka, sve boje/bojila su manje ili više bile prirodne iz različitog izvora biljnog, životinjskog ili mineralnog porekla. Proces dobijanja prirodnih boja je dug, skup i nekomercijalan. Mala količina boje se dobija preradom velike količine biljnog ili životinjskog materijala. Pored toga, prirodne boje nisu čiste supstance i nemaju uniformni kvalitet. Takođe, nisu ni otporne na svetlost i blede. Danas se samo šačica prirodnih boja koristi i skoro potpuno su zamenjene sintetičkim bojama [12, 60, 64].

Era sintetičkih boja počinje razvojem sintetičke organske hemije. Prva sintetička boja, mauvein, napravljena je 1856 godine. Njihova proizvodnja je daleko jeftinija (7×10^5 - 1×10^6 t/god) i danas postoji više od 100 000 različitih komercijalno dostupnih sintetičkih boja, od kojih se dve trećine koriste u tekstilnoj industriji. Skoro sve sintetičke boje su proizvedene upotrebom ugljovodonika, kao što je benzen, toluen, naftalin i antracen. U svakodnevnom životu, prisutne su svuda oko nas, a njihova primena i dalje kontinuirano raste [28, 48, 60, 61, 64, 66].

U zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije boje, boje mogu imati akutne i/ili hronične efekte na izložene organizme. Prisutnost boje, već u koncentracijama od 1 mg/l, u pijaćoj vodi, čini vodu nepodobnom za ljudsku upotrebu, kako za piće tako i za kuvanje, pranje i kupanje. Pored svoje toksičnosti po vodeni svet i inhibicije rasta mikroorganizama, mnoge sintetičke boje i njihovi proizvodi razlaganja, pokazuju toksičane, mutagene, kancerogene i genotoksične efekte kod ljudi. Neka od oštećenja su: disfunkcija bubrega, mokraćne bešike, reproduktivnog sistema, jetre, mozga i centralnog nervnog sistema. Tekstilne boje mogu da izazovu i alergije, kao što su kontaktni dermatitis, alergijske reakcije u očima, iritaciju kože, sluzokože i gornjih disajnih puteva [13, 48, 49, 63].

Boje se odlikuju visokom termičkom i fotostabilnošću, kao i složenom hemijskom strukturom koja nije uvek poznata, čime im je omogućen opstanak duži vremenski period u prirodi. Izvedene su od aromatičnih i heteroaromatičnih jedinjenja. U strukturi boja, mogu se razlikovati dve važne komponente: hromofore i auksohrome. Hromofore predstavljaju sistem konjugovanih benzenskih prstenova sa jednostavnim nezasićenim grupama (hromoforne grupe) vezanih za njih. Odgovorne su za selektivnu apsorpciju svetlosti i nosioci su obojenosti sintetičkih boja. Najvažnije hromoforne grupe su: etilenska, azometinska, azo, karbonilna, nitrozo, azoksi, nitro i kinoidna. Auksohrome, nisu samo dopuna hromofore, već povećavaju afinitet boje za vlakno i čine boje rastvornim u vodi. One su ili donori ili povlače supstituentne koji menjaju ili inteziviraju boju hromofora. Neke od auksohroma su: -OH, -OR, -O⁻, -NH₂ i atomi halogena [12, 13, 49].

Boje pokazuju veliku strukturnu raznovrsnost i mogu se klasifikovati na nekoliko načina. Klasifikacija na osnovu hemijske strukture boje, posebno imajući u vidu hromoforni sistem, deli ih na: nitrozo, nitro, azo, arilmetanske, pirazolonske, tiazolonske,

ketonimidne, ksantenske, antrakinonske, kinoniminske, akridinske, kinolinske, sumporne i indigoidne. Pripadnici jedne hemijske klase ne moraju da poseduju iste karakteristike ili isti način primene. Unutar pojedinih klasa postoje i podklase [60, 65].

Najveća primena boja je u tekstilnoj industriji za bojenje vlakana. Postoje različite metode bojenja vlakana, čiji izbor zavisi od strukture i fizičkih osobina boje, kao i od hemijske prirode (pamuk, vuna, svila, celuloza acetat, poliamid, poliestar, polioakrilonitril, poliolefin) i fizičkih karakteristika vlakana. Primenjena metoda za jednu grupu boja, ne znači da će biti pogodna i za bojenje vlakana drugom grupom. U vezi s tim, drugi način klasifikacije boja, na osnovu načina primene, deli boje na: direktne, kisele, bazne, razvijene ili okorio boje, nagrizable, vat, sumporne, disperzne, reaktivne i rastvaračke boje. Ovakvom podelom boje sa sličnom strukturom mogu biti smeštene u različite grupe [12, 60, 64].

Treći način klasifikacije, deli boje na katjonske, anjonske i nejonske boje. Katjonske boje imaju veliku primenu u bojenju akrilnih vlakana, vunelih, najlon i vlakana svile, papira i kože. Nazivaju se i baznim bojama, a pozitivno naelektrisanje ih čini rastvorljivim u vodi. Obično predstavljaju hidro ili cink hloridne komplekse. Katjonska funkcionalnost se može naći kod različitih klasa boja, uglavnom kod azo, metanskih i antrakinonskim boja. Antrakinonske su skupe i slabe boje, dok su azo jake boje sa dobrim osobinama i njihovom primenom se smanjuju troškovi. Boja metilensko plavo je jedan od glavnih predstavnika, a akutna izloženost ovom bojom može da izazove povećanje pulsa, šok, povraćanje, cijanozu, kvadriplegiju, žuticu i nekrozu tkiva kod ljudi [49].

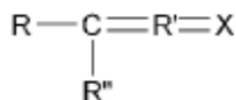
Anjonske boje takođe uključuju različite klase boja a zajednička karakteristika je njihova rastvorljivost jonskih supstituenata. Obuhvataju direktne, kisele i reaktivne boje. Većina reaktivnih boja uključuje svoju reaktivnu grupu u interakciji sa nekim vlaknom, formirajući kovalentne veze i njihovo oslobađanje u životnu sredinu je nepoželjno. Imaju nizak stepen fiksacije zbog hidrolize reaktivnih grupa u vodenoj fazi. Kisele boje se koriste za bojenje svile, vune, poliamida, modifikovanih akrilnih i olipropilenskih vlakana, a njihova štetna strana po ljude je ta što su organske sulfonske kiseline [49].

Nejonske boje su disperzne boje koje ne jonizuju u vodenoj sredini. Među disperznim bojama, antrakinonske su najviše otporne na razgradnju zbog fuzionisanog aromatičnog prstena, a neke među njima stvaraju i toksične amine [67].

Zbog velike raznovrsnosti komercijalno dostupnih boja, uveden je međunarodni sistem klasifikacija boja pomoću kolor indeksa (*Colour Index*, C.I.). Ovaj način klasifikacije uključuje strukturu, način primene, nijansu i broj boje. Kolor indeksom su boje označene dvema jedinstvenim oznakama: generičko ime i konstitucijski broj. Prva oznaka se odnosi na način industrijske primene boje i nijansu boje na osnovu koga boja dobija svoj naziv (npr: C.I. *Basic Violet 3*; C.I. *Basic Red 2*). Pored generičkog, kolor indeks registruje i više komercijalnih i tradicionalnih imena boja (npr. *Crystal Violet*; *Safranine T*). Petocifrena brojna oznaka daje informacije o strukturi boje i dodeljuje se od strane proizvođača (npr. C.I. 42555; C.I. 50240) [12, 64].

2.1.1. Arilmetanske boje

Arilmetanske boje su jedna od većih klasa boja sa opštom formulom (**Slika 2.1.**):



Slika 2.1. Opšti izgled strukturne formule arilmetanskih boja [68]

gde je x- molekul kiseonika ili azota, R i R' su benzenski ili naftalenski prstenovi, a R'' je amino grupa kod diarilmetanskih ili još jedan prsten kod daleko brojnijih triarilmetanskih boja. Sistem konjugovanih veza uključuje sve tri veze centralnog atoma ugljenika i sve prstenove, od kojih je jedan izvučen kao deo kinoidne konfiguracije (R' prsten opšte formule). Najčešći supstituenti na prstenovima, koji određuju karakteristike boje, su amino (NH₂) ili hidroksilne (OH) grupe. U vezi s tim, u grupu arilmetanskih boja mogu se razlikovati četiri familije [68]: diarilmetanske boje, aminotriarilmetanske boje, hidroksitriarilmetanske boje i hidroksiaminotriarilmetanske boje.

2.1.1.1. Triarilmetanske boje

Triarilmetanske ili trifenilmetanske boje predstavljaju jednu od najstarijih poznatih grupa sintetičkih boja. Kao svoju hromoforu poseduje kinoidnu grupu. Nastaju uvođenjem NH₂, NR₂ ili OH grupe na para pozicijama benzenovog prstena trifenil metana. Dobijena jedinjenja nazivaju se leuko-jedinjenja i bezbojna su. Oksidacijom se konvertuju u

odgovarajuće tercijalne alkohole, nazvane osnovnim bojama, koji se tretmanom kiselina menjaju iz bezbojnih benzenoidnih formi u kinoidne boje usled formiranja soli. Sa druge strane, obojene soli se pak tretmanom alkalija konvertuju u leuko-baze [60].

Prstenovi kod triarilmetanskih boja su raspoređeni u prostoru tako da imaju izgled aviona (**slika 2.2.b**). Jedan prsten je uvijen u odnosu na druga dva, koji bi predstavljali propelere aviona. U ovoj grupi se mogu naći boje sa nijansama od crvene do plave, uključujući i ljubičastu i zelenu. Kod aminotriarilmetanskih boja, prstenovi su pre naftalneski nego benzenski. Od baznih grupa prisutne su sekundarne ili tercijarne amino grupe, čija brojnost može biti manja od sulfonskih, čineći boje anjonskim. Najvažniji predstavnici su: malahit zelena, rozanilin, pararozanilin, anilin plava, kristal violet (KV) i metil violet [60, 68].

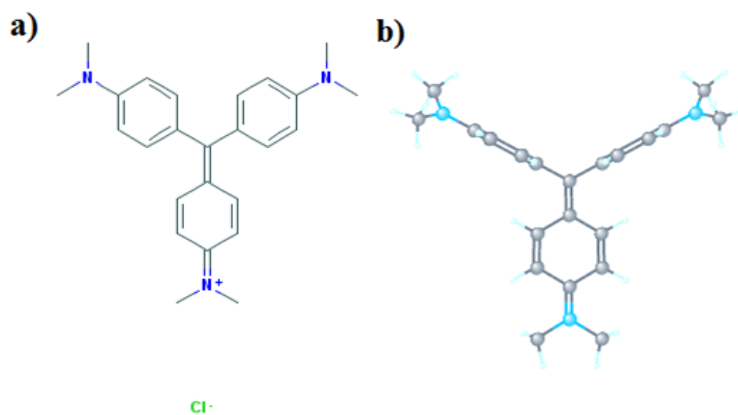
Hirdoksitriarilmetanske boje su anjonske boje, kod kojih su bar dva karbociklična prstena vezana za centralni atom ugljenika koji nosi fenolni ili kinoidni atom kiseonika. Na arilnim prstenovima mogu se naći i drugi supstituenti, kao što su: karboksilna, alkil grupa, sulfonska grupa kiselina, ili halogeni atomi. Ovi supstituenti određuju efekat pH na hromofore i mogu dozvoliti formiranje metalnih kompleksa. Zbog toga se među njima nalaze one koji su važni pH indikatori i one koje mogu vezati jone metala (nagrizne boje). Neki od predstavnika su: Aurin ili Rezolik kisele boje i Hrom violet [60, 68].

Primena triarilmetanskih boja je velika i koriste se u različitim industrijama. Na svetlu brzo blede, pa je iz tih razloga njihova primena u tekstilnoj industriji ograničena. Dosta se koriste za bojenje papira, traka za pisanje i drugih stvari, gde nije od velikog značaja postojanost boje na svetlu. Zatim, koriste se u biologiji i medicini, a zapažena je i njihova primena u kozmetici. Najčešće se koriste: KV, metilen violet, malahit zelena i brilijant zelena [60, 69].

2.1.1.1.1. Kristal violet

Boja KV se pojavljuje u literaturi sa nekoliko trivijalnih naziva: heksametil pararosanilin hidrohlorid, heksametil parafuksan, bazna violet 3, gencianin violet ili metil violet 10B. Molekulska formula boje je $C_{25}H_{30}N_3Cl$, molekulska težina 407,979 g/mol, a hemijska struktura prikazana je na **slici 2.2**. Može se dobiti zagrevanjem Mičlerovog

ketona sa dimetilanilinom u prisustvu karbonil ili fosforil hlorida. Ako se koristi karbonil hlorid, KV se dobija direktno. Apsorpcioni maksimum (λ_{\max}) za KV se kreće između 585 i 594 nm. Rastvor KV boje slabih kiselina je ljubičast, jakih kiselina zelen i veoma jakih kiselina i veoma jakih baza žut, što se dovodi u vezu sa njegovom primenom kao pH indikator (od žute do ljubičaste sa tranzicijom na pH 1,6) [28, 60, 70, 71].



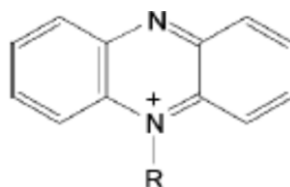
Slika 2.2. Hemijska 2D (a) i 3D (b) struktura molekula boje kristal violet [72]

Pored ove primene, postoji i niz drugih primena. Ako se krene sa aspekta medicine i veterine, KV predstavlja bakteriostatički agent i spoljašnje dezinfekciono sredstvo kože čoveka i životinja. U laboratorijama predstavlja višenamensku boju, ali najviše se koristi u postupku za bojenje bakterija po gramu. Zatim, u forenzici za identifikaciju krvavih otisaka prstiju pošto pripada proteinskim bojama. Tekstilna industrija koristi KV za bojenje svile, vune i tanin-mordantovanog pamuka, a u industriji boja se upotrebljava za pravljenje boja za slikanje, kao i mastila za olovke i štampu (grafičke boje) [28, 47, 60].

KV boja poseduje niz negativnih karakteristika. Može da izazove umerenu iritaciju i bolnu osetljivost oka na svetlost, kao i da dovede do trajnih povreda rožnjače i vežnjače, kao i slepila. Apsorpcijom kroz kožu u većim količinama, postaje toksična i iritirajuća i za kožu i za digestivni trakt. U ekstremnim slučajevima, može da dovede do otkazivanja respiratornih organa i bubrega. Poseduje kancerogene karakteristike i tvrdoglavu strukturu koju slabo metabolišu mikroorganizmi. Zbog svih navedenih posledica, redukcija i uklanjanja KV boje iz otpadnih voda, predstavlja problem od suštinskog značajakoji motiviše istraživače da usmere svoj rad u ovom pravcu [28, 47].

2.1.2. Azinske boje

Hromofora azinskih boja sadrži skelet fenazina, planarno heterociklično jedinjenje koje se sastoji od dva benzeova prstena vezanih atomima azota. Dakle, hromoforni sistem se sastoji od delokalizovanog pozitivnog naelektrisanja i alternacije aromatične i kinoidne strukture. Različiti supstituenti (R) mogu biti vezani za jedan od fenazinskih atoma azota. Opšta struktura azinskih boja prikazana je na **slici 2.3**.

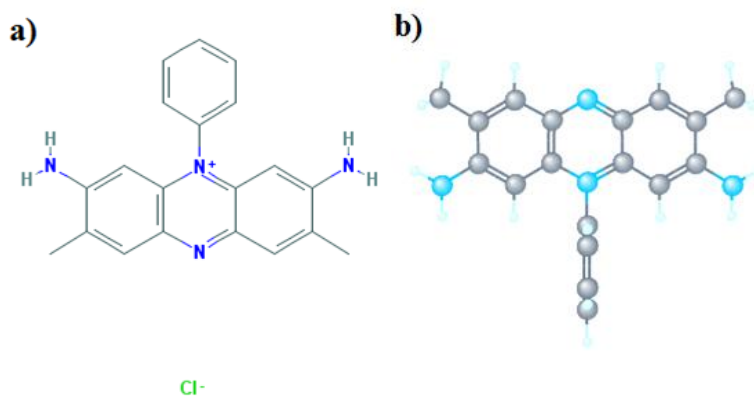


Slika 2.3. Opšti izgled strukturne formule azinskih boja [68]

Kod azinskih boja, jedan ili dva od šest atoma ugljenika prstenova, u opštoj formuli, mogu biti deo većeg sistema spojenih prstenova. Iako su hromofore uglavnom katjonske, neke azinske boje mogu biti i anjonske jer su sulfonski supstituenti brojniji od katjonskih. Pored prve sintetičke boje mauvein, neutralna crvena (R - atom vodonika) i safranin T (R - fenil grupa) najpoznatiji su predstavnici ove grupe [68].

2.1.2.1. Safranin T

Boja safranin T (ST) pojavljuje se u literaturi pod trivijalnim nazivom safranin O. Molekulska formula ST je $C_{20}H_{19}N_4Cl$, a molekulska težina 350,845 g/mol. Hemijska struktura ST prikazana je na **slici 2.4**. Po IUPAC nomenklaturi njen naziv glasi: *3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilhlorid*. ST je crvena, bazna boja iz azinske grupe boja sa hromoforom iz kinoniminske klase [73, 74].



Slika 2.4. Hemijska 2D (a) i 3D (b) struktura molekula boje safranin T [75]

ST je najčešće korišćena fenazinska boja i to kao boja za hranu sa aromom, kao što su kolači i bombone. Vrlo je poznata kao tekstilna boja, gde se koristi za bojenje tanina, pamuka, vune, svile, kože i papira. Prečišćena boja se upotrebljava i u fotografiji i u različitim biološkim mikrotehnikama. Kod ljudi može da izazove iritaciju oka, kože i respiratornih organa, kao i trajne povrede rožnjače čoveka i zečeva [74, 76, 77].

2.2. Prečišćavanje industrijskih obojenih otpadnih voda

Uklanjanje boja iz industrijskih otpadnih voda predstavlja izazov kako za zakone vlade, koji zahtevaju njihovu obradu, tako i za ekologe i istraživače, koji pokušavaju da razviju efikasne postupke za potpuno uklanjanje boja iz istih. Proces prečišćavanja industrijskih otpadnih voda obično se sastoji od nekoliko koraka. Pre nego što se ispuste u komunalni ili u centralni industrijski kanalizacioni sistem, otpadne vode prolaze kroz postupke: predtretmana, primarne obrade, sekundarne obrade i završne obrade (obrada mulja i njegovo odlaganje). Najbolji pristup bi bio da se otpadne vode direktno prečišćavaju u okviru postrojenja gde su i nastale, jer se tako smanjuju troškovi prečišćavanja, a prečišćene vode ponovo koriste [28, 48, 49, 59, 78, 79].

2.2.1. Postupci obrade otpadnih voda

Opšta podela postupaka za uklanjanje boja iz otpadnih voda, je izvršena na tri kategorije: fizičke, hemijske i biološke. Kod fizičkih postupaka dominira primena fizičkih

sila i najčešće primenjivani fizički postupci su: taloženje (sedimentacija), filtracija (mikro-, ultra- i nanofiltracija), reverzna osmoza i adsorpcija. Zatim, kod hemijskih postupaka boja se uklanja ili se konvertuje tokom hemijskih reakcija (redukcije, oksidacije, jonske razmene i neutralizacije) uz dodatak hemikalija (agenata), dok se kod bioloških postupaka podrazumeva upotreba katalitičke moći mikroorganizama u cilju smanjenja količine sintetičkih boja u otpadnim vodama [11, 28, 29, 48, 59, 61, 80].

Svaki od ovih postupaka ima svoje prednosti i nedostatke. Mnogi od njih nisu primenljivi na velike razmere. Najčešći problemi vezani su za visoku cenu obrade i odlaganja nastalog otpada (mulja). Drugi problemi koji se javljaju su: formiranje sporednih proizvoda, stvaranje aromatičnih amina, dugo trajanje procesa obrade i neefikasnost za sve vrste boja [28, 48, 59, 80].

U današnje vreme ne postoji jedinstven i adekvatan postupak sposoban da izvrši kompletnu obradu obojenih otpadnih voda zbog njihove složene prirode. U praksi se daje prednost primeni tretmana sa integrisanim procesima, gde se kombinacijom različitih postupaka postiže željeni kvalitet obrađene vode na što ekonomičniji način. Otpadne vode koje sadrže boju se uglavnom obrađuju fizičko-hemijskim postupcima, sa ili bez primene bioloških. Na primer, fizičko-hemijskom obradom se smanjuje složenost molekula boje kako bi se olakšala njena dalja obrada specijalnim biološkim tretmanom [29, 48, 56, 80].

2.2.2. Adsorpcija

U skladu sa bogatim podacima iz literature, adsorpcija je jedna od najpopularnijih i superiornih fizičkih metoda za uklanjanje zagađivača, pa i boje, iz otpadnih voda. Pravilno dizajniran proces adsorpcije će proizvesti visoko kvalitetan proizvod, obrađenu otpadnu vodu. Tehnikom adsorpcije se uklanjaju, koncentrišu ili minimizuju određene klase zagađujućih materija iz vodenog rastvora, posebno onih koje nisu lako ili nisu uopšte biorazgradive. Prednosti su: višestruka primena otpadne vode u smislu smanjenja inicijalnih troškova, fleksibilnost i jednostavnost dizajna i lakoća rukovanja, neosetljivost na druge supstance, mogućnost ponovne upotrebe adsorbenta nakon regeneracije i neformiranje sporednih proizvoda sa štetnim karakteristikama [26, 29].

Pored ranije opisanih faktora koji mogu da utiču na proces adsorpcije, u realnim sistemima pored adsorbata u vodenim rastvorima mogu biti prisutne i druge rastvorene supstance, kao što su neorganske soli, koje potencijalno mogu da utiču na efikasnost izdvajanja boja. Neka istraživanja su pokazala da sa porastom koncentracije natrium-hlorida dolazi do malog smanjenja uklanjanja katjonskih boja. Verovatno dolazi do takmičenja između katjonske boje i neorganskih katjona u vezivanju za aktivna mesta na površini adsorbenta. Na osnovu više istraživanja, može se zaključiti da neorganske soli ne ometaju adsorpciju ni baznih ni kiselih boja na alternativnim adsorbentima čak i pri visokim koncentracijama, što je jako bitno za njihove potencijalne praktične primene [13].

Istorija primena aktivnog uglja kao adsorbenta u prečišćavanju otpadnih voda datira još iz drevnih vremena. Ali danas se ipak daje prednostu primeni alternativnih i ekonomski isplativih adsorbenata za uklanjanje boje iz otpadnih voda. Mnogi od njih su testirani i predloženi od strane istraživača. Zbog velike raznovrsnosti alternativnih adsorbenata na jednoj strani i složene prirode obojenih otpadnih voda na drugoj strani, teško je uspostaviti jedan opšti kriterijum za primenu određenog adsorbenta za određeni cilj [12, 13, 29]. Adsorpcija boje na površini alternativnih adsorbenata, veoma je heterogena po svojoj prirodi i prilično komplikovan proces u kome mogu biti efikasni različiti mehanizmi koji još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Razlog tome je činjenica što je proces adsorpcije jedan komplikovan proces i zavisi i od nekoliko interakcija (elektrostatičkih i/ili neelektrostatičkih (hidrofobnih) interakcija). Zbog jonske prirode boje, u vodenom rastvoru elektrostatičke sile privlačenja ili odbijanja igraju važnu ulogu između molekula boje i jonoizmenjivačkih aktivnih grupa na površini adsorbenta. Tako na primer, adsorpcija kod većine alternativnih adsorbenata, poreklom od agroindustrijskih nus-proizvoda je kontrolisana fizičkim silama uz neke izuzetke kada je prisutna i hemisorpcija [13, 26, 30]. U strukturi većine prirodnih adsorbenata obično su prisutne karboksilne i hidroksilne funkcionalne grupe i koje su podvrgnute disocijaciji u odgovarajućim uslovima pH, formirajući negativno naelektrisane delove na površini adsorbenta, što olakšava zadržavanje katjonskih boja. Sa druge strane, neki popularni adsorbenti, kao što je hitozan, sadrži aminogrupe koje mogu biti protonizovane u kiseljoj sredini, što im povećava pozitivno naelektrisanje i na taj način njihovu sposobnost da vežu anjonske boje. Značaj

prisutnosti različitih funkcionalnih grupa na proces adsorpcije, se ogleda u tome da različiti hemijski tretmani mogu da izmene adsorpcione sposobnosti adsorbentata [13]. Pregled nekih ranijih istraživanja o adsorpciji KV boje na različitim adsorbentima prikazana je tabelom 2.1.

Tabela 2.1. Adsorpcija boje kristal violet na različitim adsorbentima

Adsorbent	Q* (mg/g)	R**	Adsorbent	Q* (mg/g)	R**
Jalshakti® super upijajući polimer	12,90	[81]	prah semena papaje (<i>Carica papaya</i> L)	85,99	[82]
Br-smola	76,80	[83]	kristalni mineral tuf	170,01	[84]
AU [#] od ljuske kokosa	40,00	[85]	koko-treset	119,20	[86]
magnetni hitozan	53,84	[87]	prašina iz drvne industrije	37,83	[88]
AU od ljuske pirinča + ZnCl ₂	61,57	[89]	prah kore bora (<i>Pinus roxburghii</i>)	32,78	[90]
AU od kokosovog drveta + H ₃ PO ₄	60,42	[91]	AU od kokosovog drveta + H ₂ SO ₄	85,84	[91]
AU od ljuske pirinča + H ₂ SO ₄	64,87	[89]	biomasa <i>Ceriporia lacerata</i>	239,25	[92]
plovućac u prahu	1,34	[93]	NaOH-ljuske pirinča	44,87	[94]
AU od kajsije	89,00	[95]	kora grejpfruta	254,16	[47]
AU od perikarpa <i>Ricinus Communis</i>	106,95	[96]	otpadna biomasa (<i>Nostoc linckia</i>)	159,00	[70]
pirinčane mekinje	42,25	[94]	ljuske badema	85,47	[97]
kora pomorandže	11,50	[98]	kokosovo jezgro	65,53	[88]
kora banane	12,20	[98]	vlakna uljane palmice	78,90	[99]
crveni mulj	60,50	[100]	đumbir	277,70	[101]
otpadni crni čaj	35,00	[102]	vlakna šećerne trske	10,44	[88]
pirinčana slama + C ₆ H ₈ O ₇	77,18	[103]	ljuske suncokreta (<i>Helianthus annuus</i> L)	90,07	[104]
ljuske jajeta	70,03	[105]	ZnCl ₂ - kajsija	63,53	[106]
otpadna espresso kafa	36,82	[21]	mekinje pšenice	80,37	[30]

[#]AU: aktivni ugalj;

*Q: Adsorpcioni kapacitet (mg/g);

**R: referenca.

2.2.3. Biorazgradnja

Biorazgradnja predstavlja separaciju hemijskih vrsta posredstvom metabolizma različitih mikroorganizama. Biorazgradnja sintetičkih boja nije samo rezultat obezbojavanja boja (raskinu veze u hromofornom centru), već i fragmentisanje molekula boje na manje i jednostavnije delove (razgradne proizvode) delovanjem različitih enzima. [107]. Postupci biorazgradnje su veoma atraktivni i nude potencijalne prednosti nad fizičkim i hemijskim postupcima jer su relativno jeftiniji, a krajnji proizvodi su kompletno mineralizovani i nisu toksični. Prednost se daje upotrebi celih mikroorganizama jer su manje opasni po životnu sredinu u odnosu na izolovane enzime, čije je dalje prečišćavanje skupo. Međutim, njihova primena je često ograničena iz tehničkih razloga jer zahtevaju veliku površinu i duže vreme trajanja postupka, osetljivi su na toksičnost nekih drugih hemikalija i postupci su konstruisani tako da su malo fleksibilni tokom svog rada [11, 29]

U postupcima obrade industrijskih obojenih otpadnih voda biorazgradnjom, mogu se koristiti različiti mikroorganizmi (bakterije, gljive, kvasci i alge). Među njima, neki imaju specifične prednosti u odnosu na druge, što se ogleda u različitim kapacitetima za biorazgradnju istih ili različitih boja. Mikroorganizmi su sposobni da akumuliraju boju i/ili da je biorazgrade delovanjem svojih enzima. Razvijanje efikasnog postupka biorazgradnje zahteva izbor adekvatnih sojeva mikroorganizama za biorazgradnju boja pod povoljnim uslovima kako bi se iskoristio njihov biorazgradni potencijal. Takođe, mogu i da je samo adsorbuju na svojoj površini, ali ovakav način uklanjanja boja nije pogodan za dugoročne postupke obrade otpadnih voda. Boja će se koncentrisati na biomasi, koja se vremenom mora zameniti, a zasićena odložiti. Ovakav sled događaja nije cilj kada je reč o biološkim postupcima obrade [29, 48, 67, 107].

Biorazgradnja boje se može postići pojedinačnim ili zajedničkim odnosno združenim delovanjem mikroorganizama (konzorcijumom mikroorganizama). Mikrobiološke kulture često zahtevaju, pre upotrebe u postupku biorazgradnje, aklimatizaciju, rast u prisustvu male koncentracije boje, kako bi bile što efikasnije. U konzorcijumu mikroorganizama, vrste zajedničkim kometaboličkim delovanjem dopunjavaju jedna drugu i samostalno nisu sposobne da obave isti posao. Pojedinačne vrste

mogu da razlažu molekul boje na različitim mestima ili mogu koristiti razgradne proizvode boje, nastale delovanjem drugih vrsta. Sastav konzorcijuma tokom razgradnje se stalno menja što otežava i samu kontrolu procesa [11, 108]. Na primer, mikrobiološki konzorcijum koji sadrži i gljive i bakterije, može biti efikasniji u biorazgradnji i mineralizaciji sintetičkih boja u poređenju sa onim konzorcijumom koji čine ili samo gljive ili samo bakterije vrste. Gljive mogu da započnu razgradnju boja koje su otporne prema bakterijskoj biorazgradnji, ali ipak za kompletno uklanjanje organskog ugljenika, bakterije su neophodne.

Imobilisani mikroorganizmi su takođe korišćeni za biorazgradnju sintetičkih boja. Čelije su bile imobilisane na dva načina: ili su vezane ili su uhvaćene u takozvane matrikse. Imobilisane kulture mogu posedovati veći nivo aktivnosti i mogu biti otpornije na promene uslova okruženja, kao što su pH ili izloženosti toksičnim koncentracijama boje, u odnosu na suspenziju. Imobilizacijom se pruža i mogućnost njihove višestruke primene. Na primer, bele gljive imobilisane na alginatu, bile su efikasnije u biorazgradnji azo Oranž II boje u odnosu na neimobilisane [107]. Pregled nekih ranijih istraživanja o biorazgradnji KV boje različitim vrstama mikroorganizama predstavljen je **tabelom 2.2.**

Tabela 2.2. Biodegradacija boje kristal violet različitim vrstama mikroorganizama

Mikroorganizam	Koncentracija boje	UB* (%)	Period inkubacije	R**
Gljive				
<i>Fusarium solani</i>	2,5 mg/l	98	2 dana	[107]
<i>Trametes</i> sp. SQ01	15 mg/l	37	7 dana	[109]
<i>Penicillium simplicissimum</i>	100 mg/l	95	14 dana	[110]
Bakterije				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	50 mg/l	>90	10 h	[111]
<i>Citrobacter</i> sp.	5 µM	100	1 h	[112]
<i>Nocardia corallina</i>	2,3 µM	100	24 h	[107]
<i>Pseudomonas putida</i>	60 µM	≈80	7 dana	[107]
<i>Shewanella decolorationis</i>	50 mg/l	≈100	28 h	[107]
<i>Shewanella</i> sp. NTOU1	50 mg/l	80	28 h	[4]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	750 ppm	62	12 h	[4]
Kvasci				
<i>Trichosporon beigelii</i>	50 mg/l	57	24 h	[107]

*UB: uklanjanje boje (%);

**R: referenca.

2.2.3.1. Faktori koji utiču na biorazgradnju boja

Ekosistemi su dinamička okruženja sa promenljivim abiotičkim uslovima, kao što su pH, temperatura, prisustvo kiseonika, metala, soli i tako dalje. Mikroorganizmi, koji igraju ključnu ulogu u globalnom ciklusu kruženja ugljenika, azota i sumpora, zavisni su od promena uslova sredine. U vezi s tim, da bi se ocenio potencijal različitih mikroorganizama za biorazgradnju sintetičkih boja, potrebno je uzeti u razmatranje efekte svih faktora sredine. Za dostizanje maksimalne brzine uklanjanja boje u procesima obrade otpadnih voda, uticaji svih operativnih parametara, moraju biti optimizovani, čime će se doprineti razvoj industrijskih bioreaktora za bioremedijaciju i olakšaće se primena bioloških metoda u tretmanima obojenih industrijskih otpadnih voda [11, 107].

2.2.3.1.1. Uticaj pH

Optimalna pH vrednost za uklanjanje boje često je neutralna ili slabo alkalna, dok pri jako alkalnim ili kiselim uslovima, brzina uklanjanja boje naglo opada. Iz tih razloga su otpadne vode često puferisane kako bi se poboljšao učinak uklanjanja boje mikrobiološkim kulturama. Generalno, gljive i kvasci su pokazali bolju aktivnost u dekolorizaciji i biorazgradnji pri blago kiselim i neutralnim vrednostima pH, dok su bakterije efikasnije pri neutralnim i baznim vrednostima pH [11, 107].

2.2.3.1.2. Uticaj temperature

Temperatura je važan faktor jer su biorazgradne aktivnosti mikroorganizama veoma osetljive na promenu temperature. Blaži sredinski uslovi su favorizovaniji jer prijaju i rastu mikroorganizama a i dekompoziciju boje. Takođe, ne mora da znači da će pri istim temperaturama biti favorizovan i rast mikroorganizama i biorazgradnja. Različite vrste gljiva imaju različite optimalne temperature za rast. Za većinu, optimalan rast i biorazgradnja se postiže pri temperaturama u opsegu između 25 °C i 35 °C. Što se tiče bakterijskih vrsta, optimalne temperature za većinu idu do 37 °C, ali neretko i do 42 °C. Generalno, je usvojeno da se najbolji rezultati biorazgradnje sintetičkih boja mikroorganizama postižu pri temperaturama u opsegu od 25 °C do 37 °C [12, 107].

2.2.3.1.3. Uticaj početne koncentracije boje

Uticaj početne koncentracije boje na mikrobnu biorazgradnju sintetičkih boja je dosta izučavana. Utvrđeno je da se efikasnost procesa smanjuje sa povećanjem početne koncentracije boje u sistemu. Ovo smanjenje biorazgradnje, sa porastom početne koncentracije boje, se pripisuje toksičnosti boje na rast mikroorganizama pri višim koncentracijama. Na primer, za neke boje (Malahit zelena i KV) pokazano je da prouzrokuju veliko smanjenje rasta mikroorganizama čak i pri manjim koncentracijama (0,050 g/l) [11, 107].

2.2.3.1.4. Uticaj sadržaja azota u medijumu

Dodatni izvor azota u medijumu može da utiče kako na rast mikroorganizama, tako i na dekolorizaciju medijuma, biorazgradnjom sintetičkih boja istim. Prisustvo azota u medijumu, na primer, kod gljiva utiče na proces dekolorizacije boja, jer menja produkciju enzima gljiva. Kod nekih vrsta, lignolitička aktivnost je pre potisnuta nego stimulisana pri visokim koncentracijama azota u medijumu (25-60 μM). Takođe, pokazano je da je biorazgradnja azo boja bolja pri ograničenim pa čak i oskudnim količinama azota, nego kada je azot prisutan u dovoljnim količinama ili u višku. U nekim slučajevima, dodavanje azota naknadno u medijum, inhibiralo je biorazgradnju Kongo crvene boje [107].

2.2.3.1.5. Uticaj soli

Otpadne vode iz tekstilne industrije sadrže različite kiseline, alkalije, soli ili metalne jone kao nečistoće. U otpadnim vodama izmerene su koncentracije soli koje su išle i do 15-20 %. U vezi s tim, jako je bitno odrediti toleranciju mikroorganizama na prisustvo različitih koncentracija soli pri biorazgradnji boja kako bi bili što uspešniji u prečišćavanju takvih otpadnih voda. U te svrhe se koristi fiziološki rastvor različite koncentracije (0-60 g/l NaCl) kako bise procenilo potencijalno inhibitorno dejstvo na mikroorganizme u biorazgradnji boje [107, 108].

2.2.3.1.6. Uticaj statičkih i dinamičkih uslova

Postoje mnoge kontradiktornosti izveštaja u pogledu uticaja mešanja na mikrobnu biorazgradnju sintetičkih boja. Prema nekim autorima, dekolorizacija je poboljšana pri dinamičkim, dok prema drugim autorima pri statičkim uslovima. Veće uklanjanje boje pri dinamičkim uslovima je prisutno zbog boljeg transfera kiseonika i distribucije komponenti u smeši u poređenju sa statičkim uslovima. Takođe, u nekim slučajevima, pri statičkim uslovima dekolorizacija je veća, jer su tada enzimi efikasniji i aktivniji. Kada se procenjuje uticaj faktora mešanja, treba uzeti u obzir i nivo aeracije sistema. Naravno, koji će uslov biti bolji ipak zavisi i razlikuje se od vrste do vrste mikroorganizama. Svakako, ovaj parametar mora da se uzme u razmatranje i ne može se generalizovati njegov uticaj [11, 107].

2.2.3.2. Vrste biorazgradnje

Proces biorazgradnje može biti:

- aeroban
- anaeroban
- kombinovani (anaerobno/aerobni)

Biološki tretmani nisu uvek u stanju da postignu zadovoljavajuće rezultate trenutno postojećim konvencionalnim procesima biorazgradnje sintetičkih boja, jer je većina njih otporna na mikrobiološko delovanje. Posebno se ističu azo boje koje, zbog svoje ksenobiotičke prirode, nisu potpuno biorazgradive. Zbog toga se intenzivno radi na adaptaciji postojećih ili se traga za izolovanjem novih sojeva koji će biti efikasni u biorazgradnji određenih boja [29, 108].

2.2.3.2.1. Aerobna biorazgradnja

Aerobna biorazgradnja je proces koji se dešava u okruženju, u prirodnim ekosistemima kao što su zemljište ili površinske vode. U postrojenjima za prečišćavanje obojenih otpadnih voda, aktivni mulj nije sposoban da ravnomerno vrši dekompoziciju sintetičkih boja konvencionalnim aerobnim procesima [12, 13].

Bakterije i gljive su dve grupe mikroorganizama čije sposobnosti su najviše istraživane u prečišćavanju obojenih otpadnih voda. Više od dvadeset i pet godina se intenzivno radi na identifikaciji i izolaciji aerobnih bakterija koje su sposobne da razgrade različite boje. U aerobnim uslovima, bakterije proizvode ekstracelularne enzime koji razgrađuju organska jedinjenja. Ipak, često se svi pokušaji završavaju sa jednim sojem koji je usko specifičan u biorazgradnji određene sintetičke boje. U poređenju sa gljivama, bakterijska biorazgradnja je brža. Mnoge trifenilmetanske boje sa efikasnošću od 92-100 % su obezbojene sa *Kurthia* sp., dok je smanjenje HPK bilo preko 70 %. Dugo se smatralo da se azo boje ne mogu metabolisati pri aerobnim uslovima. Ipak su pronađene neke specifične aerobne bakterije koje su sposobne da oslabe azo vezu putem enzimskih reakcija, pa čak i da ih potpuno mineralizuju uz dodatak energije i ugljenika za rast. Aerobna biorazgradnja različitih aromatičnih amina (anilin, karboksilni aromatični amini, hlorovani aromatični amini, benzidini, sulfonovani aromatični amini) je intenzivno proučavana i za mnoge od njih je utvrđeno da su razgradivi [12, 13, 107].

Što se tiče gljiva, puno se radilo sa njima, a među najuspešnijima su bele gljive koje imaju i centralno mesto u globalnom ciklusu ugljenika. One proizvode širok spektar ekstracelularnih enzima, oksidoreduktaze, koje razgrađuju jako stabilna jedinjenja kao što su lignin, celuloza i hemiceluloza. Lignocelulozni materijali se sastoje delom od kompleksnih molekula sa sličnim strukturama kao tekstilne boje. Pomenuti ekstracelularni enzimi, lakaze, lignin peroksidaze, fenol oksidaze, mangan zavisne i mangan nezavisne peroksidaze, daju gljivama potencijalno visok biorazgradni kapacitet i znatan biotehnoški interes. Iz gore navedenih činjenica, njihova primena u procesima obrade otpadnih voda je intenzivno istraživana, i dala je pozitivne rezultate. Neke od istraživanih efikasnih gljiva, iz ove grupe, su: *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes hirsute*, *Trametes versicolor*, *Rhizopus oryzae*, *Cyathus bulleri*, *Coriolus versicolour* i *Funalia trogii* [12, 108]. Za razliku od bakterija koje su najčešće supstrat specifične, ova specifična grupa gljiva je pokazala sposobnost da mineralizuje širok spektar boja. Ovakva sposobnost lignolitičkih gljiva da oksiduju različite organske zagađivače, dolazi od njihovog ekstracelularnog nespecifičnog i

nestereoselektivnog enzimskog sistema, koga čine: lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze [107].

Mali broj istraživanja je sprovedeno sa kvascima i u poređenju sa bakterijama i filamentoznim gljivama, kvasci imaju mnoge prednosti. Ne samo što rastu brzo kao i bakterije, već imaju i sposobnost da opstanu u nepovoljnim sredinama kao filamentozne gljive [107].

2.2.3.2.1.1. Rod *Streptomyces*

Rod streptomiceta (*Streptomyces*) taksonomski pripada klasi *Actinobacteria*, redu *Actinomycetales* i familiji *Streptomycetaceae*. Ranije su predstavnici ovog roda svrstavani među gljive, mada i dalje vlada mišljenje da su one posrednici između gljiva i bakterija. Sastav ćelijskog zida je tipičan za gram pozitivne bakterije i nukleus nema membranu. Morfološki se razlikuju od jednostavnih bakterijskih štapića i jedinstvene su među bakterijama jer formiraju filamentozne micelije, vazdušaste hife i konidijalne spore tokom svog životnog ciklusa. Pokazuju složeni viševićijski razvoj sa diferencijacijom organizma u različita „tkiva”, kao i granat filamentozni vegetativni rast omogućen vazdušastim hifama koje imaju duge lance reproduktivnih spora. Tokom životnog ciklusa ne dolazi do smenjivanja haploidne i diploidne faze, jer je utvrđeno da vazdušaste hife nastaju kao jednostavni bočni ogranci vegetativnih hifa, a ne nad kolonijama. Za razliku od drugih eubakterijskih genoma, hromozomi roda streptomicete su linearni, a oba kraja sadrže jedinstvena obrnuta terminalna ponavljanja, vezane terminalne proteine. Jedna od jedinstvenih karakteristika genoma je prisustvo biosintetskih klaster gena za kodiranje enzima koji doprinose proizvodnji sekundarnih metabolita različitih hemotipova [113-116].

Zbog velikog diverziteta sekundarnih metaboličkih proizvoda, ovaj rod je od velikog značaja za komercijalnu proizvodnju različitih antibiotika koji se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini, kao i u poljoprivredi. Dve trećine prirodno dobijenih antibiotika su poreklom iz ovog roda. Tu su i drugi farmaceutski proizvodi, kao što su: antitumor agenti, imunosupresivi, antiparazitski agensi, herbicidi, farmakološki aktivni metaboliti, kao i nekoliko enzima važnih u prehrambenoj industriji i drugim industrijama. Osim toga, veoma je interesantna činjenica da streptomicete nisu patogeni mikroorganizmi kao neki drugi

članovi iz istog taksonomskog reda (*Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium leprae*, uzročnici tuberkuloze i lepre) [114, 115].

Među streptomicetama, najbrojnije i najznačajnije su zemljišne aerobne bakterije. One su ključne za biotransformaciju lignoceluloze i hitina pomoću širokog spektra metaboličkih procesa, čineći ih centralnim organizmima u ciklusu ugljenika. Njihova sposobnost da razgrade lignin potiče od njihove mogućnosti da proizvode neke od lignolitičkih enzima, ekstracelularnih peroksidaza, svojstvenih gljivama. Neke streptomicete mogu da razgrade pojedinačna aromatična jedinjenja putem klasičnog aromatičnog katabolizma, kao i različite industrijske boje. Tako je na primer, vrsta *Streptomyces chrysosporium* A11, pokazala sposobnost obezbojavanja azo boja i to nekih sulfonskih azo boja, kao što su: Romazol Brillijant plava, Oranž II, Tropeolin O i Kongo crvena. Pored ovih, tu su i sulfonske polimetrične boje, Poli B-411, Poli R-418 i Poli Y-606, kao i heterociklična boja Azure B. Kasnije, ova boja se počela primenjivati u kvalitativnim i kvantitativnim metodama procene produkcije LiP i merenja njene aktivnosti [113-115, 117].

Posedovanje lakaza je negde najpoželjnije, jer deluju oksidativno na aromatične prstenove, manje su specifične, što im daje potencijal za razgradnju širokog spektra fenolnih jedinjenja i aromatičnih amina. Vrsta *Streptomyces psammoticus* MTCC 7334 je pokazala sposobnost obezbojavanja boja: Rhodamin B, Brom fenol plave, Malahit zelene, Remazol brilijant plave B, Metil narandžaste, Bizmark braon, Acid narandžaste, Auramin O, KV i Poli R-478 boje. Najuspešnija je bila kod obezbojavanja Remazol brilijant plave boje uz detekciju lakazne aktivnosti, a najniži procenat obezbojavanja bio je kod boje KV, gde lakazna aktivnost nije ni detektovana [118].

2.2.3.2.2. Anaerobna biorazgradnja

Anaerobni procesi biorazgradnje su, u poređenju sa aerobnim, jeftiniji jer je aeracija ta koja podiže cenu procesa. Pri anaerobnim uslovima postiže se nizak redoks potencijal (< -50 mV), što je neophodno za efikasno obezbojavanje boja. Demonstrirani su mnogi efikasni anaerobni postupci za biorazgradnju širokog spektra sintetičkih boja. Tačan mehanizam biorazgradnje nije uvek jasan. Postoje posredovani, intracelularni,

ekstracelularni mehanizmi, kao i različite kombinacije svih navedenih mehanizama, kao i mehanizmi koji uključuju enzime, i oni koji ih ne uključuju [13].

Poznato je da su mnoge bakterije sposobne da pri anaerobnim uslovima biorazgrade azo boje do bezbojnih amina. Kancerogenost azo boja dolazi od njih samih ali i od arilaminskih derivata proizvedenih tokom redukcione transformacije azo veza [107].

2.2.3.2.3. Kombinacija anaerobno/aerobne biorazgradnje

U cilju bolje remedijacije obojenih jedinjenja iz otpadnih voda, javila se potreba za razvojem različitih tehnologija sa sukcesivnim anaerobno/aerobnim postupcima. Anaerobno/aerobni uslovi se mogu implementirati prostornim odvajanjem dva mulja pomoću sistema sekvencijalnih anaerobno/aerobnih reaktora. Ovakvi uslovi se mogu postići i jednim reaktorom sa integrisanim anaerobno/aerobnim sistemom [13].

Prednost ovakvih procesa je kompletna mineralizacija sinergičkim delovanjem različitih organizama. Na primer, prema ovom konceptu kombinovanog anaerobno/aerobnog tretmana, azo boje se mogu ukloniti iz tečne faze anaerobnom redukcijom koju zatim prati aerobna oksidacija aromatičnih amina boje. Ovakva tehnologija se preporučuje u prečišćavanju obojenih otpadnih voda koja obećava potpuno uklanjanje azo boja iz ovih otpadnih voda [12, 107].

3. Biološki aktivni molekuli-enzimi

3.1. Opšte karakteristike

Enzimi su biohemijski katalizatori koji predstavljaju prirodni ključ za život, počev od bakterija pa sve do čoveka. Po hemijskom sastavu, enzimi su najčešće proteini velike molekulske mase, sastavljeni od L- α -aminokiselina koje sintetišu samo živi organizmi (mikroorganizmi, biljke i životinje) [119]. Enzimi kao specijalizovani proteinski molekuli ili biološki aktivni molekuli se ponašaju kao katalizatori u hemijskim reakcijama. Funkcionišu tako što snižavaju energiju aktivacije i na taj način ubrzavaju hemijsku reakciju. Oni ostaju nepromenjeni tokom reakcije u kojoj učestvuju, što im omogućava da, kad se jedna reakcija završi, uključe u drugu, potpuno nepromenjeni. Takođe, enzimi ne utiču na relativnu energiju između reagenata i produkata, dakle ne utiču na ravnotežu reakcije [120].

Strukturno, uglavnom predstavljaju veoma tesno pakovane loptaste strukture sa malim brojem unutrašnjih šupljina, koje su obično popunjene molekulima vode. Molska masa enzima se kreće od nekoliko hiljada do nekoliko miliona. Polipeptidni lanci enzima se organizuju u takozvanu sekundarnu strukturu pomoću vodoničnih veza. Karboksilni kiseonik formira vodonične veze sa amino grupama. Na taj način nastaju strukture tipa: α -heliks (polarne aminokiseline) i β -nabrane ploče (nepolarne kiseline). Daljim uvijanjem, nastaje trodimenzionalna struktura i to interakcijom R grupa na površini sa vodom i drugim R grupama na površini enzima. Ovakva struktura enzima je stabilizovana jonskim, vodoničnim i Van der Valsovim silama. Enzimi mogu biti [119, 120]:

- Monomerni, sadrže samo jedan polipeptidni lanac
- Oligomerni, sadrže veći broj polipeptidnih lanaca (di-, tetra- ili polimerični), koji mogu biti ili identični ili se razlikuju, ali koji funkcionišu zajedno kao jedna jedinica.

Konačna kvaternarna struktura se dobija povezivanjem više subjedica vodoničnim vezama. Region u kojem dolazi do direktnog kontakta enzima i supstrata naziva se aktivni centar. Veći broj enzima ima i dodatne regione za kofaktore, organske molekule ili jone metala, koji su potrebni pri katalizi reakcije. [119].

3.2. Imobilizacija enzima

Enzimi se uspešno koriste u proizvodnim procesima različitih industrija: prehrambene, tekstilne, farmaceutske, industrije piva, deterdženata i drugim industrijama, kao i u razvojnim istraživanjima. Njihova upotreba u industrijskim procesima je pogodna, jer poseduju visoku specifičnost, katalitičnost, efikasnost, rastvorljivost u vodi, netoksičnost i biorazgradivost. Pored navedenog, blagi operativni uslovi za pH, temperaturu i pritisak im daju još jednu prednost nad neorganskim katalizatorima [121, 122]

Uprkos svim ovim prednostima, upotreba enzima u industrijskom sektoru je ograničena jer:

- većina enzima je relativno nestabilna;
- troškovi izolovanja i prečišćavanja enzima su još uvek visoki;
- tehnički postupci izdvajanja enzima iz reakcione smeše nakon završenog katalitičkog procesa su skupi;
- enzimi se uglavnom koriste jednokratno.

Radi prevazilaženja nekih od navedenih problema, imobilizacija enzima se pokazala kao jedno od boljih rešenja. Proces imobilizacije je intenzivno proučavan i danas jer upotreba imobilisanih enzima dobro uspostavljena i skoro obavezna za većinu njihovih praktičnih primena [121, 123].

3.2.1. Opšte karakteristike imobilizacije enzima

Svako ograničavanje kretanja molekula enzima u prostoru predstavlja njegovu imobilizaciju. Kako bi imobilizacija bila uspešna, imobilisani enzimi moraju biti adekvatno orijentisani na supstratu ili nosaču. Imobilizacija enzima na čvrstim podlogama je od velikog značaja, jer daje mogućnost imobilisanim enzimima da se u proizvodnim procesima industrija više puta koriste, poboljšava njihovu stabilnost, obezbeđuje kotinualnost procesa, veću produktivnost, kao i lakšu kontrolu procesa i jednostavnost izdvajanja iz reakcione smeše. Takođe, postoji mogućnost modulacije katalitičkih osobina imobilisanih enzima, što se generalno postiže smanjenjem veličine kompleksa enzim-

nosač. U nekim određenim slučajevima, imobilizacijom se mogu postići i veće aktivnosti ili selektivnosti imobilisanog enzima u odnosu na slobodan enzim. Sve navedene pozitivne karakteristike imobilisanih enzima bi trebalo da traju dovoljno dugo vremena kako bi se nadoknadili troškovi njihove imobilizacije [123-125].

Imobilisani enzimi su generalno prilično stabilni. Često su stabilniji od neimobilisanih. Ovakva zapažanja su omogućila bioinženjerima da konstruišu takozvane enzimske reaktore, koji se kasnije mogu prilagođavati određenim biokatalitičkim reakcijama. Reaktori sa imobilisanim enzimima imaju prednost, kao što su: visoko enzimsko opterećenje, produžene enzimske aktivnosti, sposobnost da recikliraju proizvode, veliki protok, smanjenje troškova, energije i otpadnih proizvoda, visok prinos čistih materijala [122].

Različiti organski i neorganski čvrsti materijali su korišćeni kao nosači za imobilisane enzime. Takođe, korišćene su i membrane i vlakna, a u nekim slučajevima i rastvorljivi nosači, kao što je dekstran [126].

3.2.1.1. Imobilizacione tehnike

Izbor strategije za imobilizaciju enzima u velikoj meri zavisi od dobijanja željenih karakteristika biokatalizatora: ukupna katalitička aktivnost, efikasnost iskorišćenja katalizatora, deaktivacija, kinetika regeneracije i ukupni troškovi. Opisane su mnoge tehnike imobilizacije enzima, koje se mogu podeliti u pet osnovnih grupa [122, 124, 127]:

- kovalentna imobilizacija enzima,
- adsorpcija enzima (fenomen adsorpcije je objašnjen u prvom poglavlju),
- imobilizacije enzima u polimerne matrice,
- umrežavanje enzima,
- inkapsulacija enzima i
- imobilizacija enzima u membrane.

3.2.1.1.1. Kovalentna imobilizacija enzima

Stvaranjem pravih hemijskih, kovalentnih veza između čvrstog nosača i neesencijalnih funkcionalnih grupa molekula enzima nastaje kovalentna imobilizacija

enzima. Funkcionalne grupe koje učestvuju u formiranju veze sa nosačem su: α - i β - amino grupe, β - i γ - karboksilne grupe, fenilni prsten tirozina, sulfhidrilne grupe cisteina, hidroksilne grupe serina i imidazolne grupe histidina. Među ovim grupama, prve tri su najčešće korišćene za stvaranje hemijske veze sa nosačem, dok nosači enzima za kovalentno vezivanje mogu biti neorganskog (porozno staklo, keramika, gvožđe, inok, pesak, ugalj), organskog (celuloza, agaroz) ili sintetičkog porekla (najlon, poliakrilamid) polimeri, a ponekad i oksidi metala. Postupak kovalentnog vezivanja enzima se sastoji iz dve faze: aktivacija ili modifikacija nosača i vezivanje enzima za nosač. Neka istraživanja sugerišu da je kovalentno vezivanje enzima optimalni imobilizacioni postupak kojim se može sprečiti uklanjanje enzima sa površine nosača tokom reakcije, kao i povećati stabilnost enzima u pogledu pH, temperature i skladištenja u poređenju sa slobodnim enzimom. Međutim, druge studije su pokazale da primenom ove imobilizacione tehnike može doći do gubitka enzimske aktivnosti. Još neki od nedostataka vezanih za primenu imobilizacije su: velika potrošnja skupih reagenasa, složeni postupci aktivacije nosača, kao i složeni i skupi postupci regeneracije nosača [125, 128, 129].

3.2.1.1.2. Imobilizacija enzima u polimerne matrice

Imobilizacije enzima u polimerne matrice podrazumeva smeštanje enzima u interstinalni prostor matrice gela. Matrica gela bi trebalo da bude dovoljno porozna da kroz nju mogu nesmetano da prolaze molekuli supstrata i proizvodi reakcije, a da enzim pritom ne može da napusti matricu i pređe u okolni rastvor. Najčešće korišćeni gelovi su poliakrilamidni gelovi. Oni se sastoje od akrilamida, kao monomera i N,N'-metilenbisakrilamida (BIS), kao vezujućeg agensa. Enzim se najpre dodaje u rastvor koji sadrži oba monomera (akrilamid i BIS), a zatim se vrši polimerizacija, indukovana temperaturom ili dodavanjem hemikalija koje izazivaju formiranje gela. Nakon procesa polimerizacije, enzimi su raspoređeni u umreženu mrežu poliakrilamidnog gela. Prednosti ove imobilizacione tehnike su: jednostavnost, univerzalnost, enzim ne podleže konformacionim promenama i nije čvrsto vezan za nosač, enzim je zaštićen od delovanja spoljašnjih faktora, smanjena je mogućnost mikrobiološke kontaminacije kao i veliki izbor polaznih monomera. Nedostaci su: ograničena difuzija supstrata do enzima unutar

polimerne matrice, kao i upotreba supstrata male molekulske mase, mogućnost ispiranja enzima iz gela [125, 126].

3.2.1.1.3. Umrežavanje enzima

Kod tehnike umrežavanja, koriste se bifunkcionalni agensi koji imobilišu enzime uz istovremeno formiranje makroskopskih čestica (trodimenzionalni agregati koji su nerastvorni u vodi). Umrežavanje se može pojaviti unutar samih molekula ili između enzima i drugih molekula proteina. Može se razlikovati intramolekulska i međumolekulska (intermolekulska) umrežavanje. Aktivnost enzima zavisi od: broja formiranih poprečnih veza, veličine molekula supstrata, korišćenog agensa, koncentracije enzima, jonske jačine rastvora medijuma i koncentracije H^+ jona. U osnovi postoje dva tipa bifunkcionalnih umreživača: homo-bifunkcionalni umreživači, imaju dve ili više identičnih funkcionalnih grupa (glutraldehid) i hetero-bifunkcionalni umreživači koji imaju dve ili više različitih funkcionalnih grupa (trihlor-S-triazin). Ovaj postupak umrežavanja je sa jedne strane jednostavan, dok sa druge, može dovesti do smanjenja enzimske aktivnosti jer su mnogi enzimi osetljivi na različite agense za umrežavanje [121, 125].

3.2.1.1.4. Inkapsulacija enzima

Inkapsulacijom se enzimi obavijaju specifičnim vrstama membrana koje su čvrste i polupropustljive. Kod ove tehnike, enzimi se najčešće nalaze unutar sferne kapsule, a polupropustljive tanke membrane sfera su dizajnirane tako da sprečavaju difuziju enzima iz ograničenog prostora kapsule, kao i da propuštaju supstrat i proizvode reakcije. Inkapsulacija enzima se ostvaruje u dve faze: dispergovanjem polimera i enzima u fine emulgovane vodene kapljice i očvršćivanjem polimera na površini te kapljice. Očvršćavanje se može postići površinskom polimerizacijom, koacervacijom polimera, faznom separacijom, očvršćivanjem usled promene temperature ili izmenom jona, sušenjem polimernog materijala i drugim načinima. Glavni nedostatak upotrebe sfera je inhibicija enzima usled njihove ugradnje u membranski zid i primena supstrata male molekulske mase zbog selektivnosti membrana [125, 130].

3.2.1.1.5. Imobilizacija enzima u membranama

Neki od nedostataka inkapsulacije se mogu zaobići primenom šupljih vlakana ili membrana ultrafiltera umesto sfera. Enzimi se smeštaju u samu membranu šupljih vlakana, čija se prednost ogleda u tome što su one propustljive za molekule male molekulske mase (proizvode reakcije), a nisu za enzime i druge makromolekule. Najčešće se koriste polimerne membrane, zbog lakoće modifikovanja i prilagođavanja za određene svrhe, kao i zbog velike raznolikosti oblika (ravne, cevaste ili cilindrične membrane i membrane u obliku šupljih vlakana). Ova imobilizaciona tehnika ima pre svega veliku primenu u industrijskom sektoru, dok se imobilizaciona tehnika inkapsulacije koristi u medicinske svrhe [125].

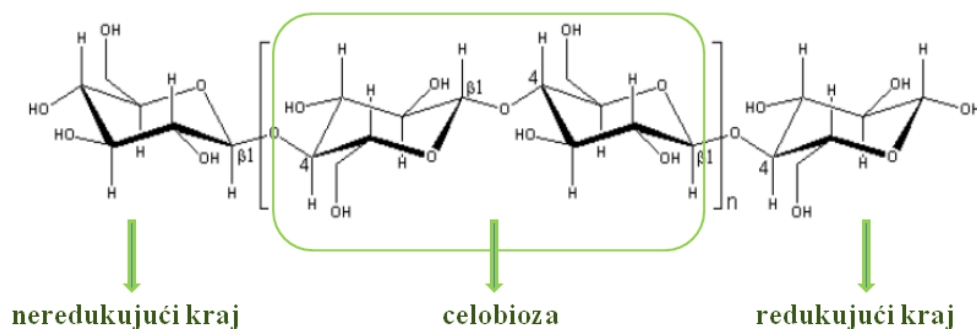
3.3. Celulaze

Gljive su dugo smatrane superiornim organizmima u svojoj sposobnosti da razgrade celulozu u odnosu na bakterije. Biorazgradnjom celuloze mikroorganizmi dobijaju neophodan ugljenik koji koriste za svoj rast i razvoj. Među gljivama, najaktivniji su pripadnici rodova: *Chaetomium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Memnoniella*, *Stachybotrys*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Penicillium* i *Aspergillus*. Kod bakterija to su rodovi: *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus* i *Brevibacillus* [131-134].

3.3.1. Celulazni kompleks

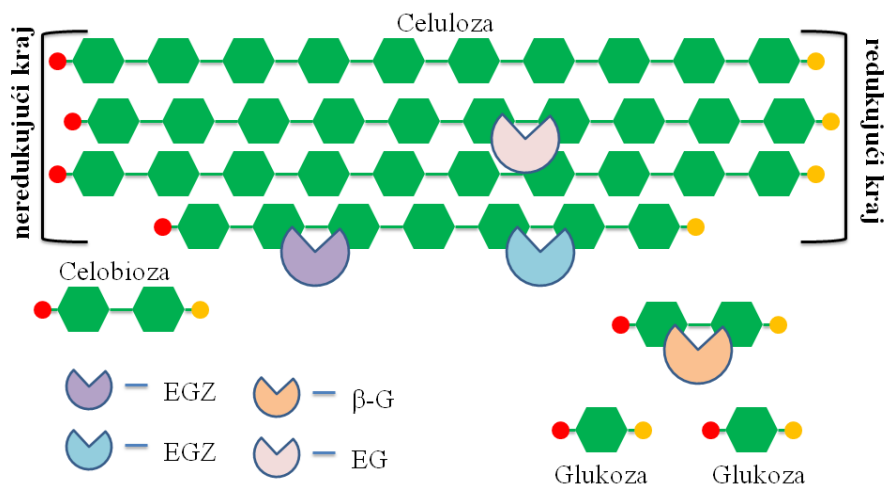
Opšta definicija celulaza glasi, da su celulaze enzimi koji hidrolizuju $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnu vezu u okviru celuloznog homopolimernog lanca, $(C_6H_{10}O_5)_n$ (slika 3.1.). Celulaze nisu pojedinačni enzimi, već predstavljaju grupu enzima, celulazni kompleks. Potpuna razgradnja celuloze do glukoze se može postići jedino sinergističkim delovanjem višekomponentnog celulaznog sistema, koga čine tri vrste enzima [135, 136]:

- endocelulaze: endo-1,4- β -D-glukanaze (EG, EC 3.2.1.4),
- egzocelulaze: egzo-1,4- β -D-glukanaze (EGZ) i
- β -D-glukozidaze (β -G, EC 3.2.1.21).



Slika 3.1. Hemijska struktura celuloznog lanca

Osnovna jedinica celuloznog lanca je glukoza, vezana međusobno vezom β -1,4. Svaki drugi glukozidni ostatak je zarotiran za 180° u ravni tako da dve susedne strukturne jedinice definišu disaharid celbiozu. Krajevi celuloznog lanca su različiti. Jedan kraj polisaharidnog niza je neredukujući, jer je anomerni atom ugljenika glukopiranozne jedinice uključen u glikozidnu vezu, dok je drugi kraj redukujući, jer je poluacetalna grupa na anomernom C atomu slobodna. (slika 3.1).



Slika 3.2. Šematski prikaz mehanizma delovanja celulaza na celuloznom supstratu

Prvi korak u razgradnji celuloze započinju EG, gde nasumično deluju i na rastvorne i na nerastvorne 1,4- β -glukanske supstrate proizvodeći oligosaharide (slika 3.2.). Njihovim delovanjem nastaju slobodni celulozni krajevi koji postaju supstrat za EGZ. EGZ celuloznog kompleksa uključuju: 1,4- β -D-glukan glukohidrolaze (EC 3.2.1.74), koje

oslobađaju D-glukozu sa 1,4- β -D-glukana i sporo hidrolizuju D-celobiozu i 1,4- β -D-glukan celobiohidrolaze (CBH, EC 3.2.1.91), koje oslobađaju D-celobiozu sa 1,4- β -glukana. Tunelska struktura CBH omogućava sukcesivno cepanje lanca na molekule celobioze i uklanjanje jednog sloja čineći osnovnu celuloznu masu dostupnu za delovanje EG. Dakle, jedna drugoj sukcesivno obezbeđuju supstrat. Završni korak u razgradnji imaju β -G, koje oslobađaju D-glukozne jedinice sa celobioze i rastvornih celodekstrina, kao i niza glikozida. Iako, β -G nisu striktne celulaze (ne napadaju kristalu celulozu), one su značajne za razgradnju jer ublažavaju povratno inhibitorno dejstvo celobioze na EG i EGZ [128, 135-138].

3.3.2. Primena celulaza

Biotehnologija celulaza je otpočela početkom 1980-tih godina, kada su prvi put primenjene u industriji hrane za životinje. Danas se uspešno koristi u proizvodnim procesima različitih industrija kao što su: industrija hrane, piva, vina, tekstila, celuloze i papira, deterdženata, farmaceutskih i poljoprivrednih proizvoda, ali i u razvojnim istraživanjima. Veliku pažnju pre svega privlače primena celulaza u konverziji lignoceluloznih materijala. Iskorišćenje otpadne celulozne biomase (drvo i agroindustrijski nus-proizvodi), kao obnovljivih resursa, za proizvodnju bioetanola, ima veliki potencijal za smanjenje emisije ugljendioksida u cilju sprečavanja daljeg globalnog zagrevanja. Među svim industrijskim enzimima u svetu, celulaze u proseku zauzimaju 14 % [121, 131, 139].

3.3.2.1. Imobilizacija celulaza

Celulaze su imobilisane na brojnim nerastvornim i rastvornim nosačima organskog, neorganskog ili sintetičkog porekla. Prednost u imobilizaciji celulaza imaju porozni materijali, posebno sintetički silika materijali, jer poseduju niz korisnih karakteristika za ovu svrhu: velika površina, gusta distribucija pora odgovarajućih veličina, hemijska i mehanička stabilnost. Istraživanja su pokazala da veličine pora i pH igraju važnu ulogu imobilizacijovih enzima, a da je aktivnost enzima jako zavisna od veličine pora. Veće pore (makropore i mezopore) olakšavaju difuziju supstrata do aktivnih centara imobilisanih enzima i olakšavaju mobilnost odnosno fleksibilnost enzima unutar šupljina, što rezultira

većom aktivnošću enzima, dok je unutrašnja površina mikropora nedostupna za celulaze velike molekulske mase [140, 141].

Mnoga istraživanja su potvrdila da se imobilizacijom celulaza i na organskim i neorganskim materijalima, mogu unaprediti stabilnost i višestruka primena enzima bez gubitka njihove katalitičke sposobnosti. Celulaze su uspešno imobilisane na: mezoporoznom silika materijalu SBA-15 i FDU-12, kalcijum alginatnom gelu, rastvorno-nerastvornom eteričnom polimeru EudragitTM L-100, modifikovanom plavcu sa $ZrOCl_2$, lipozomima, nanovlaknastim PVA membranama, silikatnim mineralima gline, sunderu Lofi (*Loofa*), Avicelu, modifikovanim lignoceluloznim materijalima, modifikovanim otpadnim materijalima od kukuruznog klipa, prahu hitozana i drugim materijalima. Aktivni ugalj se smatra pogodnim nosačem za celulaze, ali samo nekoliko istraživanja je dostupno na ovu temu. Na primer, izvršena je imobilizacija komercijalne celulaze iz *Aspergillus niger* na KAU u prahu, čistoće preko 97 %, specifične površine od $1073 \text{ m}^2/\text{g}$ i sa ukupnom zapreminom pora od $0,596 \text{ cm}^3/\text{g}$ [121, 140, 142-144].

CILJ RADA

Osnovni cilj ovog rada je da se ispita mogućnost iskorišćenja agroindustrijskog otpada, posebno repinih rezanaca i otpadne kafe

Hipoteze od kojih se pošlo u postavljanju ciljeva su sledeće:

1. Repini rezanci kao agroindustrijski otpad sadrže polisaharidne komponente (nefermentibilna biljna vlakna) koje imaju prirodni afinitet za privlačenje različitih zagađujućih materija. To omogućava primenu otpadnih repinih rezanaca u prečišćavanju industrijskih otpadnih voda. U radu je ova hipoteza testirana ispitivanjem biosorpcionog potencijala repinih rezanaca za uklanjanje katjonskih boja.

2. Procesi biosorpcije stvaraju dodatni problem odlaganja adsorbenata zasićenih zagađujućim bojama. Da bi se ovaj problem rešio, potrebno je ispitati mogućnost biorazgradnje boja sa nosača, primenom različitih nepatogenih sojeva mikroorganizama. To ujedno može omogućiti da se proizvedu preparati bezbedni za obogaćivanje poljoprivrednog zemljišta. U radu je ispitan biorazgradni potencijal bakterija iz roda *Streptomyces* sp.

3. Otpadna kafa, nastala konzumiranjem napitka, predstavlja značajan izvor biološki aktivnih komponenti, ali i polisaharidnih materija koje se mogu iskoristiti u procesima biosorpcije. Mineralni sastav otpadne kafe pokazuje prisustvo značajne koncentracije kalijuma, koji je poznat kao aktivator enzima iz grupe celulaza. Dokazivanjem efikasnosti imobilizacije celulaza na otpadnoj kafi omogućilo bi se izdvajanje ovih enzima iz sirove fermentacione tečnosti, bez primene skupih postupaka taloženja i razdvajanja. Dobijeni proizvod, koji sadrži otpadnu kafu, dobrih nutritivnih karakteristika, na koju je imobilisana celulaza, mogao bi biti iskorišćen kao komponenta stočne hrane.

Na osnovu postavljenih hipoteza, definisani su specifični ciljevi disertacije koji se mogu podeliti u pet grupa koje:

- Ispitivanje mogućnosti iskorišćenje otpadnih repinih rezanaca za efikasno uklanjanje katjonskih boja iz vodenih rastvora uz poređenje sa adsorbentom neorganskog porekla (prirodnim zeolitom);
- Optimizacija procesa adsorpcije boje korišćenjem statističke metode odzivne površine, uz pomoć *Design Expert* softvera;
- Određivanje potencijala bakterijske biorazgradnje katjonskih boja (pojedinačno i u smeši) pomoću novih izolata iz roda *Streptomyces* (*Streptomyces fulvissimus* CKS 7 i *Streptomyces microflavus* CKS 6);
- Obrada otpadne vode primenom integrisanih procesa adsorpcije i biorazgradnje;
- Iskorišćenje otpadne kafe kao nosača za adsorpciju enzima celulaza (komercijalno dostupne iz *Trichoderma reesei* i celulaze iz prirodnog izolata *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1) u cilju njihove dalje profitabilne primene u industrijskom sektoru.

EKSPERIMENTALNI DEO

4. Materijali i oprema

4.1. Materijali:

- Otpadna kafa, „Doncafe” - Espresso Aromstico - cialde, Strauss Adriatic d.o.o, Šimanovci, Srbija
- Suvi repini rezanci, „Nordic Sugar”, Kopenhagen, Danska
- Prirodni zeolit, sedimentni depozit „Zlatokop”, Vranjska Banja, Srbija
- Komercijalni enzim celulaza iz *Trichoderma reesei* ATCC 26921, „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- Mikroorganizam za proizvodnju enzima celulaze: *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 (prirodni izolat), šumsko četinarsko zemljište, Kranjska gora, Slovenija
- Mikroorganizmi za biološki tretman obojene otpadne vode: *Streptomyces fulvissimus* CKS7 i *Streptomyces microflavus* CKS6, šumsko četinarsko zemljište, Kranjska gora, Slovenija
- semena pšenice *Triticum aestivum*, lokalni market

4.2. Hemikalije i reagensi:

- 3,5-dinitrosalicilna kiselina ($C_7H_4N_2O_7$), „Acros Organics”, Nju Džerzi, SAD
- API-ZIM sistem, „bioMérieux”, SAD
- bakar (II) sulfat ($CuSO_4$), „Zorka farma”, Šabac, Srbija
- celobioza ($C_{12}H_{22}O_{11}$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- dinatrijum-fosfat (Na_2HPO_4), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- glukoza ($C_6H_{12}O_6$), „Centrohem”, Beograd, Srbija
- glutraldehid ($C_5H_8O_2$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- gvajakol ($C_7H_8O_2$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- etanol 96 % (C_2H_5OH), „Zorka farma”, Šabac, Srbija

- fenol crvena boja ($C_{19}H_{14}O_5S$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- filter papir (Whatman No.1), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- hidrolizat kazeina, „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- hlorovodonična kiselina (HCl), „Zorka farma”, Šabac, Srbija
- kalijum-bromidom (KBr), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Nemačka
- kalijum-hlorid (KCl), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- kalijum natrijum tartarat ($KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$), „Hemos”, Beograd, Srbija
- kristal violet boja ($C_{25}N_3H_{30}Cl$), „Acros Organics”, Nju Džerzi, SAD
- kvaščevev ekstrakt, „Biolife Italiana”, Milano, Italija.
- limunska kiselina ($C_6H_8O_7$), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- magnezijum-hlorid ($MgCl_2$), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- mangan (II) sulfat $MnSO_4$, „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Nemačka
- metilensko plava boja ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), „NRK-engineering”, Beograd, Srbija
- mikrokristalna celuloza-Avicel ($[C_6H_{10}O_5]_n$), „Merck”, Darmstad, Nemačka
- mlečna kiselina ($C_3H_6O_3$), „Centrohem”, Beograd, Srbija
- natrijum acetat (CH_3COONa), „Zdravlje”, Leskovac, Srbija
- natrijum-hidroksid (NaOH), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- natrijum-hlorit ($NaClO_2$), „Acros Organics”, Nju Džerzi, SAD
- natrijum-fosfat (NaH_2PO_4), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- natrijum laktat ($C_3H_5NaO_3$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Nemačka
- natrijum tartarat ($Na_2C_4H_4O_6$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- pirogalol ($C_6H_6O_3$), „Sigma-Aldrich”, Štajnhajm, Danska
- safranin T boja ($C_{20}H_{19}N_4Cl$), „Acros Organics”, Nju Džerzi, SAD
- sirćetna kiselina (CH_3COOH), „Carlo Erba”, Milano, Italija
- sukcinatna kiselina ($C_4H_6O_4$), „Acros Organics”, Nju Džerzi, SAD
- tri-natrijum citart ($Na_3C_6H_5O_7 \times 2H_2O$), „Lachema”, Brno, Češka Republika
- tartarična kiselina ($C_4H_6O_6$), „Fisher Chemical”, Engleska
- vodonik-peroksid (H_2O_2), „Lach-Ner”, Neratovice, Češka Republika
- želatin

4.3. Oprema:

- analitička vaga (AJ100), „Mettler Toledo”, Švajcarska
- autoklav, Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata „Sutjeska”, Beograd, Srbija
- automatska mikropipeta (20-200 µL), „Brand”, Nemačka
- automatska mikropipeta (100-1000 µL), „Brand”, Nemačka
- centrifuga (Sigma R model 2-16), „Sigma”, Nemačka
- električni mlin za kafu (MKM600), „Bosch”, Nemačka
- električni rešo (Bauer GH-525), „JTD.”, Severna Koreja
- espresso aparat za kafu (Didiesse FROG), „Didiesse”, Italija
- FTIR spektroskop (MB100), „Abb Bomem Inc”, Kanada
- mikrotalasna peć (MC7849HS), „LG”, Južna Koreja
- pH metar, „InoLab pH 720”, Nemačka
- SEM (JSM-6390LV), „JEOL” SAD
- sušnica, Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata „Sutjeska”, Srbija
- svetlosni mikroskop (Axio Imager A1), „Carl Zeiss MicroImaging GmbH.”, Nemačka
- tehnička vaga, „Mettler AJ100”, Švajcarska
- termostat za rast mikroorganizama, „Mettmert”, Nemačka
- ultrazvučno vodeno kupatilo, „EiRo-Vep”, Niš, Srbija
- UV/Vis spektrofotometar ultrospec 3300 pro, „Amersham Biosciences”, Australija
- vakum pumpa (V-700), „Büchi”, Švajcarska
- vazдушna tresilica (KS 4000i control), „IKA”, Nemačka
- vodeno kupatilo sa mešanjem (WB/OB 7-45), „Mettmert”, Nemačka
- vorteks (VORTEX 1), „IKA”, Staufen, Nemačka

5. Metode

5.1. Metode za pripremu uzoraka

U metode za pripremu uzoraka ubrajaju se: pripreme adsorbenata poreklom od suvih repinih rezanaca i prirodnog zeolita i nosača od otpadne kafe; priprema svežih bakterijskih kultura za biorazgradnju katjonskih boja i produkciju enzima celulaze; priprema tri vrste radnih rastvora adsorbata (kristal violet (KV), komercijalna i proizvedena celulaza), kao i priprema radnih rastvora za biorazgradnju. Za potrebe eksperimenata, pH vrednosti vodenih rastvora adsorbata su podešavani korišćenjem rastvora 0,1 M HCl ili 0,1 M NaOH.

5.1.1. Priprema biosorbenata od repinih rezanaca

Suvi repini rezanci, pod komercijalnim imenom Fibrex 620 (na 100 g, proteini 8 g; šećeri 5,500 g; masti 1 g; vlakna 67 g od kojih je hemiceluloza 42 %, celuloza 28 %, pektin 27 % i lignin 3 %; minerali 4 %) [145], najpre su mehanički obrađeni pomoću električnog mlina, a potom je samleveni materijal prosejan kroz sita veličine prečnika čestica 1,200-2,400 mm. Ovako dobijeni prah od repinih rezanaca, iskorišćen je kao biosorbent pod nazivom „neaktivirani repini rezanci”, za ispitivanje adsorpcionog kapaciteta boje KV u šaržnom režimu.

Deo samlevenih repinih rezanaca aktiviran je termički u mikrotalasnoj peći. Aktivacija je urađena pri snazi mikrotalasa od 400 W, u trajanju od 2 min, 20 %-nim rastvorom etanola (odnos čvrste (g) i tečne (ml) faze bio je 1:6). Smeša je potom profiltrirana korišćenjem vakum pumpe da bi se razdvojile čvrsta i tečna faza. Čvrsta faza je osušena do konstantne mase u sušnici preko noći (110 °C), dok je tečni ostatak odbačen. Ovako pripremljeni repini rezanci iskorišćeni su kao biosorbent pod nazivom „aktivirani repini rezanci”, za ispitivanje adsorpcionog kapaciteta boje KV u šaržnom režimu.

5.1.2. Priprema adsorbenata od prirodnog zeolita

Veličina prečnika čestica korišćenog prirodnog minerala zeolita je u opsegu od 0,063-0,100 mm. Ovakav prirodni mineral je iskorišćen kao adsorbent pod nazivom „neaktiviran zeolit”, za ispitivanje adsorpcionog kapaciteta boje u šaržnom režimu.

Deo prirodnog minerala zeolita, iste veličine čestica, termički je aktiviran u mikrotalasnoj peći. Aktivacija zeolita urađena je pri snazi mikrotalasa od 550 W, u trajanju od 10 min u staklenoj laboratorijskoj čaši. Ovako pripremljeni materijal iskorišćen je kao adsorbent pod nazivom „aktiviran zeolit”, za ispitivanje adsorpcionog kapaciteta boje KV u šaržnom režimu.

5.1.3. Priprema nosača od otpadne kafe

5.1.3.1. Obrada otpadne kafe

Čvrsti ostatak kafe, koji je prikupljen nakon pripreme espresso napitka, osušen je, do konstantne mase, u sušnici na 40 °C preko noći u cilju stabilizacije materijala. Ovako stabilizovani materijal od kafe dalje je obrađen u mikrotalasnoj peći. Izvršena je ekstrakcija polifenola sa antioksidativnom aktivnošću u uzorku rastvorom 20 %-nog etanola (odnos čvrste (g) i tečne (ml) faze bio je 1:9), pri snazi mikrotalasa od 80 W, u trajanju od 40 s. Smeša je potom profiltrirana korišćenjem vakum pumpe da bi se razdvojile čvrsta i tečna faza. Tečni ostatak je odbačen, dok je čvrsta faza osušena do konstantne mase u sušnici preko noći (105 °C). Ovako pripremljen materijal od kafe iskorišćen je i kao nosač i kao sirovina za dobijanje drugih potencijalnih nosača za adsorpciju (imobilizaciju) enzima celulaze pod nazivom „otpadna kafa”, za ispitivanje prinosa i efikasnosti imobilizacije enzima u šaržnom režimu.

5.1.3.2. Modifikacija otpadne kafe oksidacionim sredstvima

Hemijska aktivacija otpadne kafe, u cilju potpunog neutralisanja zaostalih polifenola, odrađena je modifikacijom otpadne kafe sa tri oksidaciona sredstva, u ovom slučaju vodenim rastvorima: 2,5 %-nog glutraldehida, 15 %-nog hlor-dioksida i 15 %-nog vodonik-peroksida. Odnos čvrste (g) i tečne (ml) faze bio je 1:15. Rastvor hlor-dioksida je

pripremljen korišćenjem 27 %-nog natrijum-hlorita i 10 %-ne limunske kiseline (odnos tečnih (ml) faza, redom bio je 1:5). Smeše su postavljene na vazdušnoj tresilici, na sobnoj temperaturi (25 °C) da se mešaju (150 rpm) u trajanju od 20 min. Nakon isteka predviđenog perioda mešanja, tri smeše su zasebno profiltrirane korišćenjem vakum pumpe a dobijene čvrste faze su potom isprane destilovanom vodom (dH₂O, 100 ml). Tečni ostatci su odbačeni, dok su čvrste faze osušene u sušnici do konstantne mase na 105 °C preko noći. Osušene čvrste faze su potom mehanički obrađene pomoću električnog mlina, a potom je samleveni materijal prosejan kroz sita veličine prečnika čestica < 500 µm. Ovako pripremljeni materijali od otpadne kafe modifikacijom sa glutraldehidom, hlor-dioksidom i vodonik-peroksidom, iskorišćeni su redom kao nosači za adsorpciju (imobilizaciju) enzima celulaze pod nazivima, „otpadna kafa-GIA”, „otpadna kafa-ClO₂” i „otpadna kafa-H₂O₂”, za ispitivanje prinosa i efikasnosti imobilizacije enzima u šaržnom režimu.

5.1.3.3. Priprema bakterijskih kultura

Pripremanje svežih bakterijskih kultura, koje su korišćene u eksperimentima biorazgradnje boje KV i produkcije enzima celulaze, urađena je u ISP1 tečnoj podlozi. Za pripremu 1 l ISP1 tečne podloge potrebno je da se rastvare hidrolizat kazeina (5 g) i kvašćev ekstrakt (3 g) u dH₂O (ili 0,1 M fosfatnog pufera pH 7). Nakon sterilizacije ISP1 tečne podloge u autoklavu (20 min, 121 °C), u ohlađenoj podlozi se vrši zasejavanje mikroorganizama.

Prirodni izolati, *Streptomyces fulvissimus* CKS7 (CKS7), *Streptomyces microflavus* CKS6 (CKS6) ili *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 (CKS1), su zasejani u ISP1 tečnu podlogu iz bujona odgovarajuće bakterijske kulture u odnosu 10:1 (odnos tečne (ml) i tečne (ml) faze). Smešesu postavljene na vazdušnoj tresilici, na 30 °C, da se mešaju pri brzini od 120 rpm, u trajanju od 24 h (CKS1) i 48 h (CKS7 i CKS6). Ovako pripremljene sveže bakterijske kulture (CKS7 i CKS6) korišćene su za eksperimente biorazgradnje vodenih rastvora boje KV bez prethodne adaptacije (aklimatizacije), dok se sveža bakterijska kultura CKS1 koristila za produkciju enzima celulaze.

5.1.4. Priprema radnih rastvora

5.1.4.1. Vodeni rastvor adsorbata boje kristal violet

Odmereno je 1 g boje KV u normalni sud od 1 l i dopunjen je dH₂O do crte, pri čemu je dobijena koncentracija 1 g/l. Razblaživanjem ovog početnog rastvora dH₂O, redom su pripremljeni vodeni rastvori boja koncentracija 0,009-0,291 g/l. U njima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 540 nm (maksimum absorpcije KV), prema slepoj probi (dH₂O).

Standardna kriva za određivanje koncentracije boje KV u vodenim rastvorima, konstruisana je na osnovu prethodno izmerenih ekstinkcionih vrednosti. Napravljen je stok (100 ml) poznate koncentracije 0,300 g/l i odatle su napravljena razblaženja (0,001-0,250 g/l). U uzorcima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 540 nm i na osnovu dobijenih absorbanci konstruisana je standardna kriva. Standardna kriva je prikazana u **Prilogu 1 (Slika P-1.1.)**, a za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

5.1.4.2. Vodeni rastvor adsorbata enzima celulaze

5.1.4.2.1. Vodeni rastvor komercijalne celulaze

Odmereno je 0,500 g i 1,500 g komercijalne celulaze iz *Trichoderma reesei* ATCC 26921 u normalnim sudovima od 500 ml i dopunjeni su sa 0,1 M tri-natrijum citratnim puferom pH 4,8 do crte, pri čemu su dobijene koncentracije 1 g/l i 3 g/l. Ovako pripremljeni rastvori celulaze su iskorišćeni kao uzorci pod nazivom „komercijalna celulaza” u eksperimentima imobilizacije komercijalnog enzima na prethodno pripremljenim nosačima. Egzoglukanazna aktivost u uzorcima određivana je spektrofotometrijski, a procedura je opisana u **poglavlju 7.2.2.3.**

5.1.4.2.2. Vodeni rastvor produkovane celulaze

Supstrat za uzgoj celulolitičkog soja CKS1 za sintezu celulaze pripremljen je u erlenmajeru od 1 l. Za pripremu supstrata korišćen je ISP1 hranljivi bujon uz dodatak D(+)-celobioze čija je koncentracija 5 g/l. Nakon sterilizacije tečne podloge u autoklavu (20 min,

121 °C). Određivanje potencijala bakterijske biorazgradnja katjonskih boja (pojedinačno i u smeši) pomoću novih izolata iz roda *Streptomyces* (*Streptomyces fulvissimus* CKS7 i *Streptomyces microflavus* CKS6); i nakon hlađenja, zasejan je 5 % inokulum prekonocne bakterijske kulture. Smeša je postavljena na vazdušnoj tresilici (48 h, 30 °C, 150 rpm). Nakot toga, smeša je centrifugirana (15 min, 6000 × g) kako bi se uklonile bakterijske ćelije. Dobijeni supernatant je sakupljen i čuvan na 4 °C u frižideru. Ovako pripremljen rastvor celulaze pod nazivom „sintetisana celulaza” korišćen je kao uzorak u eksperimentima imobilizacije enzima na prethodno pripremljenim nosačima od kafe. Enzimska aktivost u uzorcima određivana je spektrofotometrijski i opisana je u **poglavlju 7.2.2.3.**

5.1.4.3. Rastvori boja za biorazgradnju

Odmereno je po 0,100 g boje KV i ST u normalne sudove od 1 l i dopunjeni su ISP1 tečnom podlogom do crte, pri čemu je dobijena koncentracija 0,100 g/l. Razblaživanjem ovih početnih rastvora boja u ISP1 podlozi, redom su pripremljeni rastvori boja koncentracije od 0,001 g/l do 0,030 g/l. Nakon sterilizacije rastvora boje u ISP1 podlozi u autoklavu (20 min, 121 °C), pod sterilnim uslovima, odmereno je po 1 ml uzorka kako bi se u njima spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 584 nm (maksimum absorpcije KV) i 540 nm (maksimum absorpcije ST), prema slepoj probi (dH₂O).

Standardne krive za određivanje koncentracije boje KV i ST u ISP1 podlozi konstruisane su na osnovu prethodno izmerenih ekstinkcionih vrednosti. Napravljena su razblaženja, korišćenjem prethodno napravljenih stokova (0,100 g/l), koncentracija 0,0001-0,040 g/l. U uzorcima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 584 nm i 540 nm i na osnovu dobijenih absorbanci konstruisane su standardne krive. Standardne krive su prikazane u **Prilogu 1 (Slika P-1.2. i Slika P-1.3.)**, a za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

5.1.4.4. Otpadna voda za biorazgradnju

Otpadna voda je prikupljena nakon priprema mikrobioloških preparata za mikroskopsko posmatranje bakterija, bojenjem po Gramu.

- **Reagensi:**

Gram kristal violet rastvor – 2 g boje je rastvoreno u 20 ml 95 % etanola i potom je pomešano sa 80 ml 0,08 M amonijum oksalata.

Gram šafranin rastvor – 0,250 g boje je rastvoreno u 10 ml 95 % etanola i razblaženo sa 90 ml dH₂O.

Lugolov rastvor – 1 g joda i 1 g kalijum-jodida je rastvoreno u 300 ml dH₂O.

- **Postupak:**

Nakon pravljenja razmaza, sušenja na vazduhu i fiksiranja preparata, pristupa se bojenju preparata. Najpre se nanose 2-3 kapi boje KV i nakon 1-2 min, preparat se ispira dH₂O. Zatim se u sledećem koraku nanosi lugol. Preparat se ispira etanolom 5-10 s nakon delovanja učvršćivača boje (1-2 min). Poslednji korak je nanošenje 2-3 kapi šafranina, koja se nakon 1-2 min ispira dH₂O.

Prikupljena frakcija otpadne vode dakle sadrži obe boje, KV i ST, lugol i alkohol različitih koncentracija. Radni rastvor realnog sistema je sterilisan u autoklavu (20 min, 121 °C). Pod sterilnim uslovima, odmereno je 1 ml uzorka koji je analiziran spektrofotometrijski snimanjem spektra (450-650 nm) prema slepoj probi (dH₂O).

5.2. Dokazivanje prisustva enzima i kvantifikacija njihove aktivnosti

5.2.1. Kvalitativne metode za ispitivanje profila enzima mikrobioloških kultura CKS6 i CKS7

5.2.1.1. Test za peroksidaze

Ovaj test se koristi za vizuelno dokazivanje prisustva peroksidazne aktivnosti u inokulumu mikrobiološke kulture, a kao supstrat se koristi pirogalol.

- **Reagensi:**

13 mM pirogalol – 16,4 mg pirogalola se rastvori u 10 ml 0,1 M fosfatnog pufera (pH 7).

0,1 M fosfatni pufer (pH 7) – za 100 ml pufera pomešano je 61 ml 0,2 M dinatrijum-fosfat i 39 ml 0,2 M natrijum-fosfat u normalnom sudu (NS).

0,2 M dinatrijum-fosfat – 3,270 g Na₂HPO₄ je rastvoreno u 61 ml dH₂O.

0,2 M natrijum-fosfat – 1,076 g NaH_2PO_4 je rastvoreno u 39 ml dH_2O .

3 % vodonik-peroksid – 900 μl 30 % H_2O_2 je rastvoreno u 10 ml dH_2O u NS.

- **Postupak:**

Test je urađen u epruveti gde su pomešani pirogalol (13 mM), vodonik-peroksid (3 %) i uzorak (suspenzija kulture mikroorganizama) u odnosu 100:1:6 (redom odnos tečnih faza). Slepa proba se priprema na isti način, stim što se umesto uzorka dodaje dH_2O . Razvoj braon boje u epruvetama, nakon inkubacije (3 min, 25 °C) ukazuje na prisustvo peroksidazne aktivnosti u uzorku [146].

5.2.1.2. Test za lignin-peroksidazu

U ovom testu boja metilensko plava je iskorišćena kao supstrat za vizuelno dokazivanje prisustva lignin-peroksidazne (LiP) aktivnosti u inokulumu mikrobiološke kulture.

- **Reagensi:**

1 mM metilensko plavo boja – 0,032 mg boje je rastvoreno u 100 ml dH_2O u NS.

0,5 M natrijum tartaratni pufer (pH 4) – za 200 ml pufera pomešano je 0,068 l 1 M tartarične kiseline i 0,031 l 1 M natrijum tartarata i dopunjeno dH_2O u NS.

1 M tartarična kiselina – 15,009 g $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ je rastvoreno u 100 ml dH_2O u NS.

1 M natrijum tartarat – 11,504 g $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ je rastvoreno u 50 ml dH_2O u NS.

4,5 mM H_2O_2 – 0,051 ml 30 % H_2O_2 je rastvoreno u 100 ml dH_2O u NS.

- **Postupak:**

Test je urađen u epruveti gde su pomešani metilensko plavo (1 mM), natrijum tartaratni pufer (0,5 M, pH 4), vodonik-peroksid (4,5 mM) i uzorak (suspenzija kulture mikroorganizama) u odnosu 22:1:3:1 (rednom odnos tečnih faza). Slepa proba se priprema na isti način, stim što se umesto uzorka dodaje dH_2O . Razvoj plave do zelene boje u epruvetama, nakon inkubacije (5 min, 25 °C), ukazuje na prisustvo LiP aktivnosti uzorku [147].

5.2.1.3. Test za lakazu

Ovaj test se koristi za vizuelno dokazivanje prisustva lakazne aktivnosti u inokulumu mikrobiološke kulture, a gvajakol je iskorišćen za supstrat.

- **Reagensi:**

2 mM gvajakol – 0,025 g gvajakola je rastvoreno u 100 ml dH₂O u NS.

10 mM natrijum acetatni pufer (pH 5) – za 200 ml pufera pomešano je 0,007 l 0,1 M sirćetne kiseline i 0,013 l 0,1 M natrijum acetata i dopunjeno dH₂O u NS.

0,1 M sirćetne kiseline – 1,150 ml CH₃COOH je rastvoreno u 200 ml dH₂O u NS.

0,1 M natrijum acetata – 0,205 g CH₃COONa je rastvoreno u 25 ml dH₂O u NS.

- **Postupak:**

Test je urađen u epruveti gde se dodaje gvajakol (2 mM), natrijum acetatni pufer (10 mM, pH 5) i uzorak (suspencija kulture mikroorganizama) u odnosu 3:1:1 (redom odnos tečnih faza). Slepa proba se priprema na isti način, stin što se umesto uzorka dodaje dH₂O. Razvoj obojenosti smeše u epruvetama, nakon inkubacije (15 min, 30 °C), ukazuje na prisustvo lakazne aktivnosti u uzorku.

5.2.1.4. Test API-ZIM

API-ZIM test daje mogućnost da se odredi prisustvo enzima iz grupa: fosfataza, esteraza, amino peptidaza, proteaza i glikosil hidrolaza. U 2 ml API medijuma se doda suspencija sveže kulture mikroorganizama da bi se dobila zamućenost smeše 5-6 McFarlanda (*McFarland*). Potom je u svaki bunarčić (ima ih ukupno 19) API test trake dodato po 65 µl smeše. Zatim se test traka zatvara i ostavlja u termostat (4,5 h, 30 °C). Nakon inkubacije, dodaju se redom, u svaki bunarčić, reagensi ZimA (*ZymA*) i ZimB (*ZymB*) kako bi se zaustavila reakcija i razvila boja tokom narednih 5 min. Ukoliko se razvije boja u bunarčiću, test je pozitivan. Intenzitet boje se upoređuje sa kontrolom tablom koja se dobija od proizvođača i svakom bunarčiću se dodeljuje vrednosti intenziteta boje od 1 do 5: reakcije niskog intenziteta (1), reakcije umerenog intenziteta (2-3) i reakcije visokog intenziteta (4-5).

5.2.2. Određivanje enzimске aktivnosti

5.2.2.1. Određivanje lignin-peroksidazne aktivnosti

LiP aktivnost je određena korišćenjem boje metilenskog plavog kao supstrata.

- **Reagensi**

1,2 mM metilensko plava boja – 0,019 g boje je rastvoreno u 50 ml dH₂O u NS.

2,7 mM H₂O₂ – 0,031 ml 30 % H₂O₂ je rastvoreno u 100 ml dH₂O u NS.

- **Postupak**

Reakciona smeša za određivanje lignin peroksidazne aktivnosti se dobija mešanjem 1,100 ml uzorka (supernatanta od 2 ml suspenzije mikrobiološke kulture), 300 µl natrijum tartaratnog pufera (0,5 M, pH 4) i 50 µl boje metilensko plavo. Reakcija započinje dodavanjem 50 µl H₂O₂. Nakon inkubacije (20 min, 30 °C) intenzitet boje u uzorku se meri spektrofotometrijski na 650 nm. Aktivnost enzima se izražava kao procenat obezbojavanja boje metilensko plavo (konverzija u boju Azure C) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (umesto uzorka sa enzimom dodaje se dH₂O) [148].

5.2.2.2. Određivanje mangan peroksidaze aktivnosti

Mangan peroksidazni (MnP) test je zasnovan na oksidaciji boje fenol crvene.

- **Reagensi:**

0,25 M natrijum sukcinatni pufer (pH4,5) – za 200 ml pufera pomešano je 100 ml 0,5 M natrijum sukcinata i 0,017 l 2 M natrijum-oksida i dopunjeno sa dH₂O u NS.

0,5 M sukcinatna kiselina – 0,591 g C₄H₆O₄ je rastvoreno u 100 ml dH₂O u NS.

2 M NaOH – 7,999 g NaOH je rastvoreno u 100 ml dH₂O u NS.

5 M NaOH – 4,999 g NaOH je rastvoreno u 25 ml dH₂O u NS.

0,71 mM fenol crvena – 0,025 g boje je rastvoreno u 100 ml dH₂O u NS.

1,25 mM MnSO₄ – 0,011 g MnSO₄ je rastvoreno u 50 ml dH₂O u NS.

0,62 mM H₂O₂ – 14,060 µl 30 % H₂O₂ je rastvoreno u 200 ml dH₂O u NS.

0,25 M natrijum laktatni pufer (pH 4,5) – za 200 ml pufera pomešano je 0,082 l natrijum laktata i 0,018 l mlečne kiseline i dopunjeno dH₂O u NS.

0,5 M natrijum laktata – 5,603 g C₃H₅NaO₃ u je rastvoreno 100 ml dH₂O u NS.

0,5 M mlečne kiseline – 3,725 ml $C_3H_6O_3$ je rastvoreno u 100 ml dH_2O u NS.

0,5 % želatin – 0,500 g želatina je rastvoreno u 100 ml dH_2O u NS zagrevanjem do 60 °C.

- **Postupak:**

Reakciona smeša za merenje aktivnosti mangan zavisne peroksidaze je napravljena u epruveti i sastoji se od: po 1 ml natrijum sukcinatnog pufera, natrijum laktatnog pufera, i želatina, 700 μ l boje fenol crvene, 400 μ l $MnSO_4$ i 500 μ l uzoraka (supernatant uzorka kulture mikroorganizama). Za određivanje aktivnosti mangan nezavisne peroksidaze, u reakcionoj smeši jedino nije dodat $MnSO_4$. Reakcije započinju dodavanjem 400 μ l H_2O_2 . Tokom perioda inkubacije (4 min, 30 °C), svakog minuta se uzima 1 ml reakcione smeše i u njemu dodaje u 400 μ l 5 M NaOH kako bi se reakcija zaustavila. Uzorci su mereni spektrofotometrijski (610 nm). Aktivnost enzima je računata umanjenjem ekstinkcije zabeležene u uzorku gde je $MnSO_4$ bio odsutan. Jedna jedinica aktivnosti mangan zavisne peroksidaze se izražava kao porast absorpance za 0,1 u uzorku [149].

5.2.2.3. *Određivanje celulazne aktivnosti*

Aktivnost celulaza (egzoglukanaza – na avicelu kao supstratu), u slobodnom i imobilisanom uzorku, određivana je DNS metodom korišćenjem 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS reagensa). Metoda se zasniva na merenju redukcije 3,5-dinitrosalicilne kiseline u prisustvu glukoze koja se oslobađa enzimskom hidrolizom celuloze metodom po Mileru. Slobodne glukozne jedinice koje reaguju sa DNS-om formiraju obojeni kompleks koji se detektuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm [145, 150].

- **Reagensi:**

DNS reagens – 3,5-dinitrosalicilna kiselina (5 g) i NaOH (8 g) je rastvoreno u 200 ml dH_2O , a Na,K tartarat (150 g) u 150 ml dH_2O . Zatim su oba rastvora prebačena u NS od 500 ml i dopunjena dH_2O do crte, i na kraju je konačna smeša profiltrirana kroz filter papir.

1 % *Avicel* – 2,500 g supstrata je rastvoreno u 250 ml 0,1 M tri-natrijum citratnog pufera (pH 4,8) u NS.

0,1 M tri-natrijum citratni pufer (4,8 pH) – 14,700 g tri-natrijum citrata rastvoreno je u 500 ml dH₂O u NS, a pH vrednost rastvora podešenaje korišćenjem rastvora 0,1 M HCl ili 0,1 M NaOH.

- **Postupak:**

Reakciona smeša se priprema u epruveti mešanjem 0,500 ml supstrata i 0,500 ml/0,010 g uzorka enzima. Na vazdušnoj tresilici se vrši inkubacija smeše u trajanju od 30/60 min (50 °C, 130 rpm). Reakcija se prekida dodavanjem 1 ml DNS-a, nakon čega se uzorci zagrevaju 5 min na 90 °C u vodenom kupatilu, a potom ohlade 25 °C i razblaže dodavanjem 5 ml dH₂O. Na kraju, uzorci se profiltriraju i u njima se spektrofotometrijski očitava ekstinkcija na 540 nm (maksimum absorpcije glukoze), prema kontroli (u ovom slučaju postupak pripreme kontrole je isti kao i priprema uzorka stim što se u kontrolu dodaje uzorak enzima nakon dodavanja DNS-a). Jedna jedinica egzoglukanazne aktivnosti (μmol/ml·min) se definiše kao količina enzima potrebna da se proizvede 1 μmol glukoze u min [151].

Standardna kriva za određivanje koncentracije glukoze u rastvoru nakon hidrolize avicela konstruisana je na osnovu prethodno izmerenih ekstinkcionih vrednosti. Napravljen je glukozni stok (25 ml) poznate koncentracije 2 mg/ml i odatle su napravljena razblaženja u opsegu od 0,100-1,600 mg/ml. U svaku epruvetu dodato je po 1 ml rastvora glukoze i po 1 ml DNS-a, zatim je smeša zagrevana na 90 °C u vodenom kupatilu u trajanju od 5 min. Nakon hlađenja, u svaku epruvetu je dodato po 5 ml dH₂O, a zatim su uzorci profiltrirani i u njima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 540 nm. Na osnovu dobijenih absorbanci konstruisana je standardna kriva za glukozu i prikazana je u **Prilogu 1 (Slika P-1.4.)**, a za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

Jedinica egzoglukanazne aktivnosti rastvora enzima izračunava se po sledećoj formuli:

$$\text{egzoglukanazna aktivnost } (\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}) = \frac{1000 \cdot W}{M_r \cdot V_e \cdot t} \quad (5.1)$$

pri čemu su:

W- količina proizvedenog ekvivaleta glukoze mg, gde je $W = X \cdot V_r$,

V_r- zapremina ukupne reakcione smeše (ml),

M_r - molekulska masa glukoze (g/mol),

V_e - zapremina uzorka enzima (ml),

t - vreme trajanja inkubacije (min).

Jedinica egzoglukanazne aktivnosti imobilisanog enzima izračunava se po sledećoj formuli:

$$\text{egzoglukanazna aktivnost } (\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}) = \frac{1000 \cdot W}{M_r \cdot m \cdot t} \quad (5.2)$$

pri čemu je:

m - masa nosača sa imobilisanim enzimom.

5.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenta

Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenta podrazumeva karakterizaciju njegove aktivne površine. U vezi sa tim, određene su i definisane osnovne površinske funkcionalne grupe na adsorbentima od prirodnog zeolita, repinih rezanaca i otpadne kafe korišćenjem FTIR tehnike, njihovo naelektrisanje merenjem tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka), a izgled i struktura površine adsorbenta pomoću mikrografa skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM).

5.3.1. Određivanje površinskih funkcionalnih grupa korišćenjem FTIR tehnike

Najpre su svi uzorci (adsorbenati od prirodnog zeolita, repinih rezanaca i otpadne kafe) za snimanje FTIR spektra osušeni do konstantne mase. Potom je odmereno 0,600 mg uzorka i pomešano sa 200 mg prethodno užarenog kalijum-bromida, kako bi se pripremila čestica veličine 2 μm . Smeša je potom uz pomoć hidraulične prese pod visokim pritiskom (350 MPa) presovana u specijalnom kalupu. Dobijena okrugla pločica je potom ubačena u aparat za merenje (FTIR spektroskop) na 25 °C, gde je opseg talasih dužina 400-4000 cm^{-1} , sa rezolucijom 4 cm^{-1} .

5.3.2. Određivanje površinskog naelektrisanja pomoću tačke pH_{pzc}

Naelektrisanje površinskih funkcionalnih grupa određivano je merenjem tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka):

- **Reagensi:**

0,01 M natrijum-hlorid (NaCl) – 0,292 g NaCl rastvoreno je u 500 ml dH_2O u NS.

- **Postupak:**

U šest erlenmajera od 100 ml sipano je po 50 ml 0,01 M NaCl, u kojima je pH redom podešavan od 2-12 dodavanjem 0,1 M HCl i 0,01 M NaOH. Zatim, u svakom sudu je pojedinačno dodato po 0,150 g adsorbenta (adsorbenti od prirodnog zeolita, repinih rezanaca, otpadne kafe, otpadna kafa-GIA, otpadna kafa- ClO_2 i otpadna kafa- H_2O_2 i svaki je dobro zatvoren čepom. Smeše su postavljene na vazдушnu tresilicu (48 h, 25 °C, 120 rpm). Nakon toga, u svakom uzorku izmerena je krajnja pH. Tačka pH_{pzc} očitavana je sa grafika $\text{pH}_{\text{početno}}-\text{pH}_{\text{krajnje}}$, pri čemu je pH_{pzc} tačka preseka dveju krivih. Za crtanje grafika, korišćen je softver OriginPro® v8.0.

5.3.3. Određivanje površinske strukture korišćenjem tehnike SEM

Za dobijanje SEM mikrografa o izgledu i strukturi površine nosača otpadna kafa, kafa-GIA, otpadna kafa- ClO_2 i otpadna kafa- H_2O_2 , svaki uzorak nosača je prethodno osušen do konstantne mase. Potom je pre snimanja prekriven zlatom, a zatim je posmatran skenirajućim elektronskim mikroskopom (uz pogonski napon od 20 kV), pri uvećanju od 700 puta.

5.4. Postupak procesa adsorpcije u šaržnom režimu

Proces adsorpcije boje KV na otpadne repine rezance i zeolitu, kao i imobilizacija enzima celulaze na nosaču od otpadne kafe izvedeni su šaržnom režimu, i tom prilikom određeni su odgovarajući kinetički i ravnotežni parametri.

5.4.1. Adsorpcija boje kristal violet

U erlenmajerima od 250 ml dodata je odgovarajuća količina adsorbenta i 100 ml odgovarajuće koncentracije vodenog rastvora KV boje. Svi uzorci su postavljeni na vazdušnoj tresilici, na 25 °C, da se mešaju pri brzini od 200 rpm (za repine rezance) i 150 rpm (za zeolit) u toku zadatog vremenskog perioda. Nakon isteka zadatog perioda mešanja, uzorci su filtrirani i analizirani spektrofotometrijski radi određivanja rezidualne koncentracije u uzorku.

Adsorpcioni kapacitet (mg/g) je izračunat korišćenjem sledeće jednačine:

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t) \times V}{W} \quad (5.3)$$

pri čemu su:

q_t - količina KV boje na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu u vremenu t (mg/g),

C_0 - početna koncentracija rastvora KV boje (mg/l),

C_t - koncentracija rastvora KV boje u vremenu t (mg/l),

V - zapremina rastvora KV boje (100 ml),

W - količina adsorbenta u uzorku (g).

Procenat uklanjanja adsorbata iz vodenog rastvora određen je korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{uklanjanja boje (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (5.4)$$

pri čemu su:

C_0 - početna koncentracija rastvora KV boje (mg/l),

C_t - koncentracija rastvora KV boje u vremenu t (mg/l).

5.4.2. Optimizacija procesa adsorpcije

Optimizacija procesa adsorpcije boje KV na repine rezance i prirodni zeolit, kao i statistička obrada podataka, urađena je primenom metodologije odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) uz pomoć softverskog paketa *Design Expert*.

Primarna svrha korišćenja odzivnih površina u eksperimentima je određivanje optimalnih operativnih uslova, a ne razumevanje mehanizma odigravanja procesa u

eksperimentu. Planiranjem eksperimenata omogućava se simultano variranje više različitih faktora. Određuju se njihovi pojedinačni i međusobni uticaji, odnosno opisuje se njihov ukupan efekat na proces i dobijaju se informacije o ispitivanom procesu uz relativno mali broj ponavljanja eksperimenata. Iz navedenih razloga, ovakva metodologija je praktičnija u odnosu na konvencionalne pristupe [32, 145].

RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika, koje se koriste u izradi povezanih kontrolnih promenljivih (ulazne promenljive) koje su označene sa x_1, x_2, \dots, x_k . Može se aproksimirati sledećim polinomalnim modelom:

$$y = f'(x)\beta + \varepsilon \quad (5.5)$$

gde je $x = (x_1, x_2, \dots, x_k)'$, $f(x)$ vektor funkcije p elemenata određenog stepena d ($d \geq 1$), β vektor p nepoznatih konstantnih koeficijenata označenim kao promenljive i ε je slučajna eksperimentalna greška. Dobijeni matematički model prikazuje se grafički, kao odzivna površina u vidu dvodimenzionalnih ili trodimenzionalnih grafika.

Glavni ciljevi razmatranja ovog modela (**jednačina 5.5**) su [152, 153]:

- uspostavljanje veze, iako približne, između odziva i parametara koja se može koristiti za predviđanje vrednosti odziva sa datom postavkom kontrolnih promenljivih,
- utvrđivanje, kroz testiranje hipoteza, značaj faktora čiji nivoi su predstavljeni promenljivama,
- određivanje optimalnih postavki promenljivih da bi se dobili maksimalni ili minimalni odzivi preko određene oblasti od interesa.

Dva najčešće korišćena matematička modela u klasičnoj RSM predstavljaju posebne slučajeve modela datog **jednačinom 5.5**. To su modeli prvog ($d=1$) i drugog reda ($d=2$) i predstavljeni su redom sledećim polinomalnim **jednačinama 5.6** i **5.7**:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (5.6)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \dots + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (5.7)$$

gde su: x_i, x_j, \dots, x_k nezavisne promenljive, $x_{2i}, x_{2j}, \dots, x_{2k}$ i $x_i x_j, x_i x_k, \dots, x_j x_k$ redom kvadratni i interakcioni efekti promenljivih, $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \dots, \beta_{ij}$ regresioni koeficijenti, pri čemu

se β_i ($i=1, 2, \dots, k$) odnosi na linearni efekat, β_{ii} ($i=1, 2, \dots, k$) na kvadratni efekat, β_{ij} ($i=1, 2, \dots, k; j=1, 2, \dots, k$) interakcioni efekat [153, 154].

Promenljive u modelu mogu biti najefikasnije određene ukoliko se koristi odgovarajući eksperimentalni dizajn za prikupljanje podataka. Dizajn se može predstaviti matricom, označenom kao \mathcal{D} , reda oznake $n \times k$ (n je broj eksperimenata) nazvanom matricom dizajna:

$$\mathcal{D} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \cdot & \cdot & \ddots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdots & \cdot \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{bmatrix} \quad (5.8)$$

gde x_{ui} označava postavku podešavanja u -tog dizajna od x_i ($i = 1, 2, \dots, k; u = 1, 2, \dots, n$). Svaki red matrice predstavlja tačku, označenu kao tačku dizajna, u k -dimenzionalnom Euklidovom (*Euclidean*) prostoru [152, 154].

Pravilan izbor dizajna je od velikog značaja u svim istraživanjima gde se koristi RSM. Kvalitet predviđenih vrednosti odziva, koje se računaju na osnovu veličine predviđene varijanse, zavise od matrice dizajna. Metoda najmanjih kvadrata je iskorišćena za određivanje promenljivih u polinomalnoj aproksimaciji. Analiza odzivne površine se izvodi njihovim fitovanjem gde, ukoliko je fitovana površina adekvatna aproksimacija prave funkcije odziva, onda će analiza fitovane površine biti aproksimativno jednaka analizi stvarnog sistema. Dizajni koji fituju samodelima prvog reda nazivaju se dizajni prvog reda, a oni koji fituju sa modelima drugog reda, označeni su kao dizajni drugog reda. U radu sa RSM postoje tri glavne faze: dizajniranje eksperimenta (odabir nezavisnih ulaznih promenljivih koje značajno utiču na traženi odziv, odabir eksperimentalnog dizajna i sprovođenje eksperimenta), aproksimacija odzivnih površina datog modela (matematička i statistička obrada podataka i evaluacija i verifikacija modela) i optimizacija odziva [152, 154].

5.4.2.1. Optimizacija procesa adsorpcije boje kristal violet na repine rezance

Procena uticaja procesnih parametara na efikasnost uklanjanja boje KV iz vodenog rastvora pomoću adsorbenata (neaktivirani i aktivirani repini rezanci), urađena je izborom Boks-Benken (*Box-Behnken*, BBD) dizajna sa četiri numerička faktora (ulazne procesne promenljive): količina adsorbenta (A), početna koncentracija boje (B), vreme trajanja procesa (C) i početna pH rastvora boje (D) (**Tabela 5.1.**). Procesne promenljive su odabrane na osnovu pregleda literaturnih podataka iz ove oblasti [1, 3, 7]. U postavci samog dizajna, za sve numeričke faktore uvek je primenjen nivo tri. Procesne promenljive i njihove granične vrednosti date su u **Tabeli 5.1.** Na ovaj način dobijen je kvadratni model sa 29 tačaka (zasebnih eksperimenata) od kojih je 24 faktorijalnih, a 5 centralnih tačaka (**tabela P-2.1. u prilogu 2**).

Tabela 5.1. Procesne promenljive i njihove granične vrednosti u eksperimentalnom dizajnu korišćenjem neaktiviranih/aktiviranih repinih rezanaca

Faktori	Jedinica	Oznaka	Granične vrednosti		
			-1	0	+1
Količina adsorbenta	g/l	A	5	15	25
Početna koncentracija boje	g/l	B	0,050	0,150	0,250
Vreme trajanja procesa	s	C	30	315	600
Početni pH rastvora boje		D	3	6	9

5.4.2.2. Optimizacija procesa adsorpcije boje kristal violet na zeolitu

U okviru RSM, izabran je central kompozitni dizajn (CCD) sa tri numerička faktora: količina adsorbenta (A), početna koncentracija boje (B) i vreme trajanja procesa (C), čije su granične vrednosti date u **Tabeli 5.2.**

Tabela 5.2. Procesne promenljive i njihove granične vrednosti korišćenjem adsorbenata od prirodnog zeolita

Faktori	Jedinica	Oznaka	Granične vrednosti				
			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Količina adsorbenta ^a	g/l	A	1,9	5	12,5	20	23,1
Početna koncentracija boje ^a	g/l	B	0,009	0,050	0,150	0,250	0,291
Vreme trajanja procesa ^b	s	C		120	600	1200	

^a: Numerički faktor;

^b: Diskretni numerički faktor.

Procesne promenljive su u ovim eksperimentima adsorpcije odabrane na osnovu pregleda literaturnih podataka vezanih za adsorpciju boja [155, 156]. Na osnovu preliminarnih rezultata, utvrđeno je i da je optimalna pH rastvora za adsorpciju KV na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu pH 6. U vezi s tim, u ovim eksperimentima nije podešavana početna pH vrednost rastvora boje. U postavci dizajna, za numeričke faktore A i B primenjen je nivo pet sa rotabilnim faktorom $\alpha=0,310$, dok je za numerički faktor C primenjen treći nivo sa rotabilnim faktorom $\alpha=1,000$. Na ovaj način, dobijen je kvadratni model sa 30 tačaka, od kojih je 12 faktorijalnih, 12 aksijalnih, a 6 centralnih tačaka (**tabela P-2.2. u prilogu 2**).

5.4.3. Adsorpcija enzima celulaze

U balonu od 100 ml sa okruglim dnom odmereno je 1 g nosača od otpadne kafe i 20 ml rastvora komercijalne celulaze. Svaki eksperiment odrađen je u triplicatu. Smeše su postavljene na vazdušnoj tresilici (2 h, 40 °C, 150 rpm). Nakon toga, čvrsta faza je odvojena od tečne filtriranjem pomoću filterpapira, isparna dH₂O i osušena na 25 °C. Egzoglukanazna aktivnosti rezidualnog rastvora, kao i imobilisanog enzima, određen je spektrofotometrijski.

Uspeh imobilizacije celulaze na nosaču od otpadne kafe je utvrđen procenom sledeća dva parametra: prinos imobilizacije (PI, %) i efikasnost imobilizacije (EI, %) [157, 158].

Parametar PI se koristi da opiše procenat enzimске aktivnosti imobilisanog enzima na nosaču u odnosu na ukupnu enzimsku aktivnost slobodnog enzima u rastvoru i određen je na osnovu sledeće jednačine:

$$PI (\%) = 100 \cdot \left(\frac{\text{aktivnost imobilisanog enzima}}{\text{polazna aktivnost enzima}} \right) \quad (5.9)$$

pri čemu se:

aktivnost imobilisanog enzima – se određuje merenjem enzimске aktivnosti polaznog rastvora enzima ($\mu\text{mol}/\text{min}$) koja je umanjena za rezidualnu aktivnost enzima u zaostalom rastvoru enzima nakon imobilizacije ($\mu\text{mol}/\text{min}$),

polazna aktivnost enzima – enzimska aktivnost polaznog rastvora enzima ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

Parametar EI se koristi da opiše procenat enzimске aktivnosti imobilisanog enzima i određen je sledećom jednačinom:

$$EI (\%) = 100 \cdot \left(\frac{\text{posmatrana aktivnost}}{\text{aktivnost imobilisanog enzima}} \right) \quad (5.10)$$

pri čemu je:

posmatrana aktivnost – enzimska aktivnost imobilisanog enzima izmerena na nosaču ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

5.4.4. Kinetika i mehanizam procesa adsorpcije

Kinetika procesa adsorpcije određivana je u šaržnom režimu.

5.4.4.1. Kinetika procesa adsorpcije na repine rezance

Odmereno je 4 g adsorbenta (neaktivirani/aktivirani repini rezanaci) i 200 ml vodenog rastvora boje KV početnih koncentracija 0,050-0,250 g/l u erlenmajerima od 250 ml. Svih pet erlenmajera su smešteni u vazdušnu tresilicu (180 min, 25 °C, 150 rpm). Uzorci (5 ml tečnog dela smeše), uzimani su u određenim vremenskim intervalima, filtrirani i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne koncentracije boje u radnom rastvoru.

5.4.4.2. Kinetika procesa adsorpcije na prirodnom zeolitu

Odmereno je 2 g adsorbenta (neaktiviran/aktiviran zeolit) i 100 ml vodenog rastvora KV boje početnih koncentracija 0,050-0,250 g/l u erlenmajerima od 250 ml. Svih pet erlenmajera su smešteni u vazдушnu tresilicu (60 min, 25 °C, 150 rpm). Uzorci (5 ml tečnog dela smeše), su uzimani u određenim vremenskim intervalima, filtrirani i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne koncentracije boje u radnom rastvoru.

5.4.4.3. Kinetika procesa adsorpcije na otpadnoj kafi

Odmereno je 5 g adsorbenta (nosač otpadna kafa-ClO₂) i 200 ml vodenog rastvora komercijalne celulaze (3 g/l) u erlenmajerima od 500 ml. Smeša je postavljena na vazdušnoj tresilici na različitim temperaturama (30, 35, 40 i 45 °C), da se meša brzinom od 150 rpm u trajanju od 70 min. Uzorci (5 ml tečnog dela smeše), su uzimani u određenim vremenskim intervalima, filtrirani i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne egzoglukonazne aktivnosti u radnom rastvoru.

Adsorpcioni kapacitet (U/g) je izračunat korišćenjem sledeće jednačine:

$$q_t = \frac{(C_{a0} - C_{at}) \times V}{m} \quad (5.11)$$

pri čemu su:

q_t - količina egzoglukonazne aktivnosti na nosaču od kafe u vremenu t (U/g),

C_{a0} - početna egzoglukonazna aktivnost rastvora (U/ml),

C_{at} - egzoglukonazna aktivnost rastvora u vremenu t (U/ml),

V- zapremina rastvora komercijalne celulaze (200 ml),

m- količina nosača od kafe u uzorku (g).

5.4.4.4. Analiza kinetičkih podataka

Kinetički podaci analizirani su korišćenjem modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morrisovog (*Weber-Morris*) modela međučestične difuzije. Za crtanje grafika linearizovanih oblika kinetičkih modela korišćen je softver OriginPro® v8.0.

Linearizovani oblik modela pseudo-prvog reda prikazan je sledećom jednačinom:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (5.12)$$

pri čemu su:

q_e - količine adsorbovanog adsorbata po jedinici mase adsorbenta u ravnotežnom vremenu (mg/g),

q_t - količine adsorbovanog adsorbata po jedinici mase adsorbenta u vremenu t (mg/g),

k_1 - konstanta ravnoteže konstante pseudo-prvog-reda (1/min).

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $t - \log(q_e - q_t)$ izračunati su redom parametri k_1 i q_e .

Linearizovani oblik modela pseudo-prvog-reda prikazan je sledećom jednačinom:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (5.13)$$

pri čemu su:

k_2 - konstanta ravnoteže pseudo-drugog reda (g/mg·min).

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $t - t/q_t$ izračunati su redom parametri q_e i k_2 .

Linearizovani oblik Veber-Morisovog modela međučestične difuzije prikazan je sledećom jednačinom:

$$q_t = k_{ri} t^{1/2} + C_i \quad (5.14)$$

pri čemu su:

k_{ri} - konstanta ravnoteže i -tog nivoa međučestične difuzije (mg/(g·h^{1/2})),

C_i - efekat graničnog sloja u procesu međučestične difuzije.

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $t^{1/2} - q_t$ izračunati su redom parametri k_{ri} i C_i .

5.4.5. Adsorpciona ravnoteža i izoterme

Adsorpciona ravnoteža i izoterme korišćenjem repinih rezanaca

Adsorpciona ravnoteža procesa adsorpcije boje KV iz vodenog rastvora na neaktivirane/aktiviranerepine rezance, analizirana je po idetičnom postupku opisanom u odeljku 5.4.4.1.

5.4.5.1. Adsorpciona ravnoteža i izoterme korišćenjem prirodnog zeolita

Adsorpciona ravnoteža procesa adsorpcije boje KV iz vodenog rastvora na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu, analizirana je po idetičnom postupku opisanom u odeljku 5.4.4.2.

Ravnotežni podaci su analizirani korišćenjem tri najčešće primenjivana modela izoterme: Lengmirog (Lengmirog-1 i Lengmirog-2), Frojndlihog i Tempkinovog.

Linearizovani oblik Lengmirove-1 modela adsorpcione izoterme je prikazan sledećom jednačinom:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{K_L q_m} \quad (5.15)$$

pri čemu su:

q_e - količina adsorbovane rastvorene supstance u ravnotežnom vremenu (mg/g),

C_e - ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/l),

K_L - Lengmirova konstanta (l/mg),

q_m - maksimalni adsorpcioni kapacitet formiranja monosloja na adsorbentu (mg/g).

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $C_e - C_e/q_e$ izračunati su redom parametri q_m i K_L .

Linearizovani oblik Lengmirove-2 modela adsorpcione izoterme je prikazan sledećom jednačinom:

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{K_L q_m} \right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (5.16)$$

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $1/C_e - 1/q_e$ izračunati su redom parametri q_m i K_L .

Lengmirov faktor separacije (R_L) je izračunat iz sledeće jednačine:

$$R_L = \frac{1}{1 + KC_0} \quad (5.17)$$

pri čemu su:

C_0 - početna koncentracija adsorbata (mg/l).

Linearizovani oblik Frojndlihovog modela adsorpcione izoterme je prikazan sledećom jednačinom:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} (\log C_e) \quad (5.18)$$

pri čemu su:

K_F - Frojndlihovala konstanta,

n - mera adsorpcionog intenziteta.

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $\log C_e - \log q_e$ izračunati su redom parametri n i K_F .

Linearizovani oblik Tempkinovog modela adsorpcione izoterme je prikazan sledećom jednačinom:

$$q_e = k_1 \ln k_2 + k_1 \ln C_e \quad (5.19)$$

pri čemu su:

k_1 - Tempkinova energetska konstanta (1/mol),

k_2 - Tempkinova izotermna konstanta.

5.5. Postupak procesa biorazgradnje u šaržnom režimu

5.5.1. Biorazgradnja KV boje korišćenjem vrsta roda *Streptomyces*

U erlenmajeru od 100 ml je, u sterilnim uslovima pored plamenika, zasejana kultura (određene veličine, ml) u 25 ml radnog rastvora KV boje određene koncentracije. Smeše su postavljene na vazdušnoj tresilici, na unapred određenoj temperaturi i brzini mešanja u trajanju od 24 h. Nakon isteka vremenskog intervala mešanja, uzorci (2 ml tečnog dela smeše) su centrifugirani (10 min, 10 000 × g), kako bi se odvojile bakterijske ćelije od supernatanta i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne koncentracije boje u radnom rastvoru. Takođe, snimani su i absorpcioni spektri u opsegu 450-650 nm i upoređivani sa kontrolama (početni radni rastvor KV boje). Procenat obezbojavanja radnog rastvora KV boje određen je korišćenjem **jednačine 5.4.**

5.5.2. Postupak određivanja fitotoksičnosti rastvora KV boje i njenih razgradnih proizvoda nakon biodegradacije

Studija fitotoksičnosti je urađena sa ciljem da se proceni uticaj KV boje i njenih razgradnih proizvoda nakon biorazgradnje sa mikrobiološkim kulturama na životnu sredinu. U petri kutije se razlije 25 ml smeše agra i uzorka, rastvor KV boje 0,001-0,020 g/l rastvor razgradnih proizvoda (odnos tečno (agar) i tečno (uzorak) je 4:1). Za kontrolni uzorak je korišćen čist agar. Kada se agar stegne, u svaki uzorak se dodaje po 10 pšeničnih zrna *Triticum aestivum*, a petri kutije se potom odlože u eksikator da semena kliju 4 dana. Svi uzorci su urađeni u triplicatima. Rezultati su izražavani preko parametra relativnog indeksa klijanja semena (RIKS) i razlici u dužini korenčića i izdanka uzorka i kontrole nakon isteka predviđenog vremena klijanja.

Relativni indeks klijanja semena određen je korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{RIKS}(\%) = \frac{\text{KS}_U}{\text{KS}_K} \times 100 \quad (5.21)$$

pri čemu su:

KS_U - broj proklijalih semena u uzorku,

KS_K - broj proklijalih semena u kontroli.

5.5.3. Biorazgradnja boje KV adsorbovane na otpadnim repinim rezancima

U erlenmajeru od 250 ml dodaje se 1,500 g adsorbenta i 100 ml rastvora KV boje koncentracije 0,200 g/l. Svaki uzorak je rađen u duplikatu i svi su postavljeni na vazdušnoj tresilici (315 s, 25 °C, 150 rpm). Nakon isteka zadatog vremena mešanja, uzorci su filtrirani i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne koncentracije u uzorku. Adsorpcioni kapacitet (mg/g) je izračunat korišćenjem **jednačine 5.3**.

Nakon adsorpcije i sušenja uzoraka na sobnoj temperaturi tokom 24 h, usledili su eksperimenti biorazgradnje. U erlenmajeru od 100 ml je, pod sterilnim uslovima pored plamenika, zasejana kultura (10 % inokulum) u 25 ml radnog ISP1 medijuma različite koncentracije (0, 5, 10, 20, 40, 80 i 100 %) koji se razblažuje sa fiziološkim rastvorom koncentracije 8,5 % NaCl. U svaki sud se potom dodaje po 0,010 g suvih aktiviranih

repinih rezanaca sa adsorbovanom bojom KV. Smeše su postavljene na vazdušnoj tresilici (30 °C, 120 rpm). Nakon isteka odgovarajućeg vremenskog perioda mešanja, uzorci (2 ml tečnog dela smeše) su centrifugirani (10 min, 10 000 × g), kako bi se odvojile bakterijske ćelije i repini rezanci od supernatanta i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne koncentracije boje u radnom rastvoru. Procenat obezbojavanja radnih rastvora određen je korišćenjem **jednačine 5.4**.

6. REZULTATI I DISKUSIJA

6.1. ADSORPCIJA KATJONSKE BOJE KRISTAL VIOLET NA OTPADNE REPINE REZANCE

Nakon pripreme adsorbenata od otpadnih repinih rezanaca, u skladu sa postupkom opisanom u odeljku 5.1.1., urađena je karakterizacija njihove površine i ispitana mogućnost iskorišćenja ovog agroindustrijskog otpada za izdvajanje KV boje iz vodenih rastvora procesom biosorpcije. Proces adsorpcije boje na neaktivirane/aktivirane repine rezance posmatran je u zavisnosti od vremena trajanja reakcije. Ispitivanjem kinetike procesa adsorpcije određen je model i aproksimiran mehanizam odigravanja reakcije. Izbor odgovarajuće adsorpcione izoterme doprineo je dodatnom razumevanju aktuelnog sistema. Primenom metodologije odzivne površine, pristupilo se i optimizaciji postupka adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance.

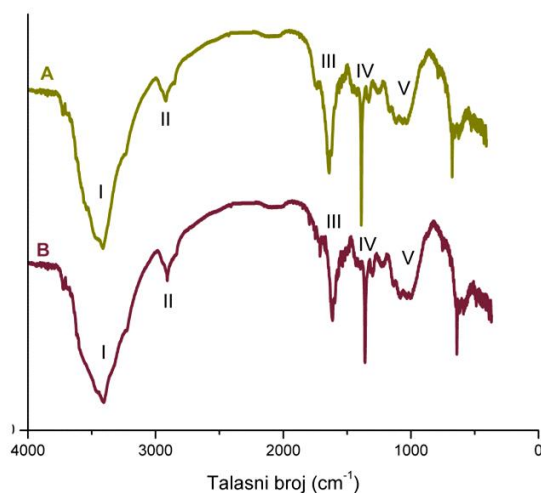
6.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenata

Karakterizacija površine neaktiviranih/aktiviranih repinih rezanaca, pre procesa adsorpcije, urađena je FTIR analizom, gde su određene i definisane osnovne funkcionalne grupe. Površinsko naelektrisanje adsorbenta određeno je pomoću tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka).

6.1.1.1. *Analiza površinskih funkcionalnih grupa*

FTIR spektri neaktiviranih (spektar A) i aktiviranih (spektar B) repinih rezanaca, pre procesa adsorpcije boje KV, prikazani su na **slici 6.1**.

Analiza FTIR spektara pokazuje karakterističan spektar za polisaharide, koji su glavni konstituenti repinih rezanaca (**slika 6.1**). Izražen signal (I) na oko 3415 cm^{-1} je posledica vibracija rastezanja hidroksilne grupe $\nu(\text{O-H})$ polisaharida. Sledeći signal (II) na oko 2925 cm^{-1} potiče od asimetričnih vibracija CH_2 grupa, a signal (IV) na oko 1384 cm^{-1} potiče od H-C vibracija istovremenog rastezanja i savijanja zasićenih grupa iz polisaharida. Pik (III) na oko 1637 cm^{-1} odgovara vodi $\nu(\text{H-O-H})$ [2, 21, 159].



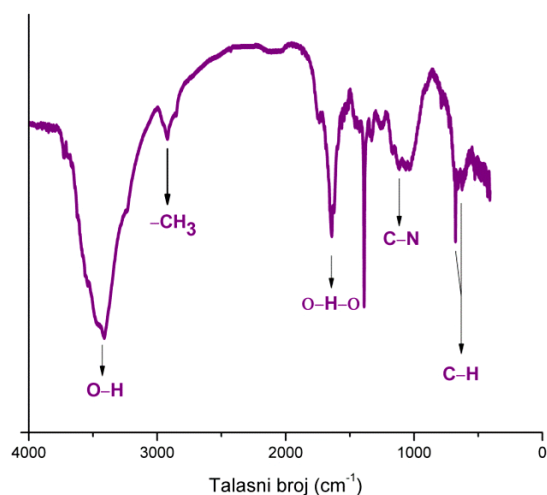
Slika 6.1. FTIR spektri neaktiviranih (A) i aktiviranih (B) repinih rezanaca pre adsorpcije boje kristal violet

Kada se upoređi region $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ spektara A i B i region oko 1650 cm^{-1} , kod aktiviranih repinih rezanaca (spektar B) intenzitet signala ovih regiona je manji, što je posledica oslobađanja molekula vode mikrotalasnom aktivacijom. Zabeleženi pik na oko 1747 cm^{-1} se odnosi na vibracije rastezanja karbonilne grupe $\nu(\text{C}=\text{O})$ ketona i aldehida [2]. Zatim, prisustvo pektina, kao još jednog konstituenta repinih rezanaca, potvrđeno je karakterističnim regionom (V), takozvanog otiska prsta, između 950 cm^{-1} i 1200 cm^{-1} koji odgovara vezama u prstenu šećera ($\text{C}_5\text{O}-$) i ukazuje na istežanje C–O veze kod C–O–C i C–OH na 1024 cm^{-1} i 1107 cm^{-1} [160, 161].

6.1.1.2. Potvrda adsorpcije boje kristal violet

Prisustvo boje KV na adsorbentu, potvrđeno je analizom FTIR spektra aktiviranih repinih rezanaca nakon procesa adsorpcije (**slika 6.2.**).

Potvrda adsorpcije boje KV na aktivirane repine rezance (**slika 6.2.**) dokazana je pojavom novog pika na 2921 cm^{-1} , koji ukazuje na prisustvo metil grupe ($-\text{CH}_3$) iz adsorbovane boje. Intenzivniji pikovi u regionu između 669 cm^{-1} i 617 cm^{-1} su posledica deformacije C–H veza supstituisanih benzenovih prstenova boje KV [21].

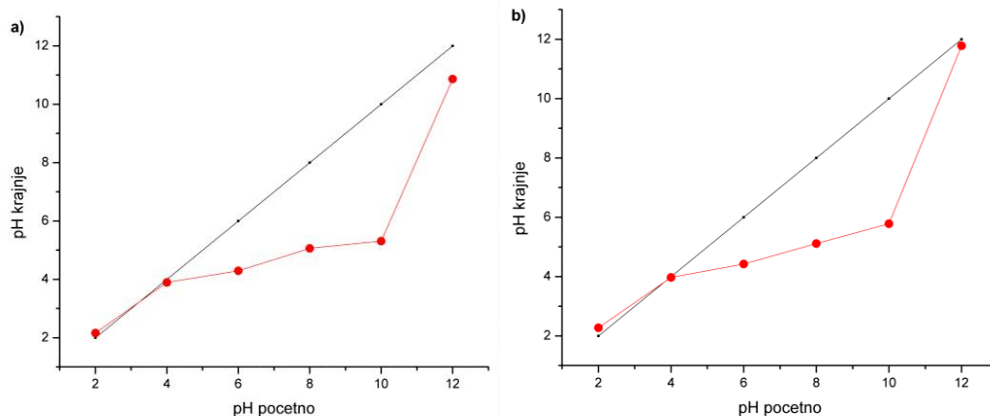


Slika 6.2. FTIR spektar aktiviranih repinih reznaca nakon adsorpcije boje kristal violet

Pored toga, pikovi na oko 1024 cm^{-1} i 1057 cm^{-1} redom su pomereni na oko 1031 cm^{-1} i 1066 cm^{-1} , dok su neki signali smanjeni ili čak nestali, jer se broj grupa smanjio nakon adsorpcije boje na površini aktiviranih repinih reznaca [7, 161]. Takođe, intenziviran je i signal na oko 1637 cm^{-1} , kao i signal u regionu od 3600 cm^{-1} do 3200 cm^{-1} , što govori o većem sadržaju vode u uzorku nakon adsorpcije boje iz vodenog rastvora.

6.1.1.3. Površinsko naelektrisanje adsorbenata

Površinsko naelektrisanje adsorbenta, kao i pH rastvora adsorbata, može da utiče na tok reakcije procesa adsorpcije. Od početnog pH rastvora zavisi stepen jonizacije materija u rastvoru i disocijacije funkcionalnih grupa adsorbenta, kao i hemijski sastav čestica adsorbata. Naelektrisanje funkcionalnih grupa na površini neaktiviranih i aktiviranih repinih reznaca određeno je merenjem tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka), što je i prikazano na **slici 6.3**. Poznavanjem vrednosti pH_{pzc} tačke olakšava se predviđanje privlačnih/odbojnih efekata površine adsorbenta prema određenoj jonskoj vrsti na datoj pH vrednosti rastvora [24, 30].



Slika 6.3. Određivanje tačke pH_{pzc} neaktiviranih (a) i aktiviranih (b) repinih rezanaca

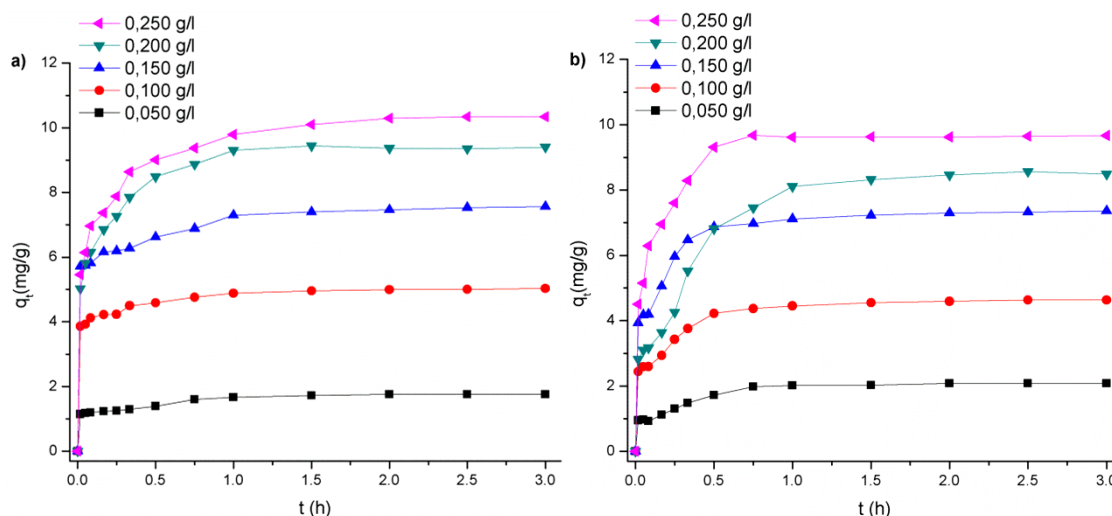
Vrednost pH_{pzc} tačke neaktiviranih repinih rezanaca iznosi 3,25, dok je vrednost za aktivirane repine rezance nešto viša i iznosi 3,9. Na osnovu toga, za sve pH vrednosti rastvora koje su veće od 3,25, površina neaktiviranih repinih rezanaca biće negativno naelektrisana. Za vrednosti pH rastvora manjim od 3,25, preovlađivaće pozitivno površinsko naelektrisanje adsorbenta. Kod primene aktiviranih repinih rezanaca, pH rastvori boje iznad 3,9 doprineće negativno površinsko naelektrisanje adsorbenta i favorizovaće adsorpciju katjonskih boja.

6.1.2. Tok reakcije i postizanje ravnoteže

Rezultati istraživanja toka procesa adsorpcije KV boje na neaktivirane/aktivirane repine rezance, grafički su prikazani na **slici 6.4**. Tok reakcije praćen je preko promene kapaciteta adsorpcije boje na adsorbente (q_t , mg/g) u zavisnosti od početne koncentracije boje i vremena trajanja procesa, odnosno vremena kontakta dve faze (tečne i čvrste).

Količina adsorbovane boje KV po jedinici mase na neaktivirane/aktivirane repine rezance, raste sa porastom početne koncentracije boje. Usled prisustva većeg broja molekula boje u rastvoru, dolazi i do većeg međusobnog „takmičenja” za dostupnim mestima na aktivnoj površini adsorbenata. Dakle, uporedo sa porastom početne koncentracije boje u rastvoru, adsorpcioni kapaciteti su bili viši i samim tim su zavisili od nje [28, 47]. Međutim, kod adsorpcije boje na aktivirane repine rezance, pri početnoj

koncentraciji od 0,200 g/l, adsorpcioni kapaciteti su bili nešto niži u odnosu na one pri koncentraciji od 0,150 g/l. Razlog ovakve pojave verovatno je taj da, u prvih pola sata reakcije, nije došlo do ravnomerne raspodele adsorbata i adsorbenta u reakcionoj smeši.



Slika 6.4. Adsorpcioni kapaciteti boje kristal violet na neaktivirane (a) i aktivirane repine rezance (b) u zavisnosti od vremena trajanja kontakta

Tokom trajanja procesa adsorpcije, na neaktivirane/aktivirane repine rezance, mogu se razlikovati dve faze. U prvim minutima eksponencijalne faze procesa, rastvorne čestice boje najpre započinju da difunduju kroz tečnu fazu ka površini čvrste faze adsorbenata, gde bivaju adsorbovane, jer se na njihovoj površini nalazi veliki broj dostupnih aktivnih mesta. Za ovu prvu fazu karakteristično je pasivno povezivanje molekula adsorbata usled površinskih reakcija, preko razmene katjona, uključujući i elektrostatičke interakcije između negativno naelektrisane površine adsorbenata i jona KV boje. Poznato je da pektinske supstance, koje čine oko trećinu suve materije ove vrste adsorbenta, snažno vezuju katjone u vodenom rastvoru. Ova sposobnost proizilazi iz posedovanja karboksilnih grupa poligalakturonske kiseline. Dakle, polisaharidi i njihovi modifikovani proizvodi imaju glavnu ulogu u adsorpciji katjonskih vrsta iz vodenih rastvora [7, 20].

Nakon ove brže faze, sledi sporija faza toka procesa adsorpcije. Broj aktivnih mesta na površini adsorbenta je sada mnogo manji i mnoga mesta su teže dostupna za molekule boje. Pošto se uporedo sa procesom adsorpcije dešava i proces desorpcije, kada dođe do

izjednačenja brzine ova dva procesa, postiže se termodinamička ravnoteža [162, 163]. Ravnoteža se postiže dva puta brže kod adsorpcije boje na aktivirane repine rezance i to nakon 45 minuta od početka reakcije. Takođe, za sve ispitane početne koncentracije boje KV, ravnoteža se postiže u isto vreme, što dovodi do zaključka da vreme potrebno za postizanje ravnoteže ne zavisi od početne koncentracije boje u rastvoru.

6.1.3. Adsorpciona kinetika i mehanizam procesa adsorpcije

Kinetika adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance analizirana je korišćenjem modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog modela međučestične difuzije. Analizom kinetičkih podataka određeno je model koji najrelevantnije opisuje dobijene eksperimentalne rezultate u funkciji operativnih parametara [104].

Tabela 6.1. Kinetički parametri adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

K. B. g/l	$q_{e,eks}$ mg/g	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		k_1 1/h	$q_{e,mod}$ mg/g	R^2	k_2 g/mg·h	$q_{e,mod}$ mg/g	R^2
<i>Neaktivirani repini rezanci</i>							
0,050	1,778	1,119	0,637	0,902	8,587	1,793	0,998
0,100	5,034	1,953	1,174	0,950	6,942	5,058	0,999
0,150	7,578	1,526	1,872	0,967	3,093	7,626	0,999
0,200	9,412	1,801	2,545	0,939	2,305	9,518	0,999
0,250	10,356	2,066	3,561	0,941	1,765	10,509	0,999
<i>Aktivirani repini rezanci</i>							
0,050	2,091	1,751	0,983	0,936	5,095	2,157	0,998
0,100	4,657	1,721	1,592	0,957	3,710	4,722	0,999
0,150	7,374	1,826	2,196	0,930	2,999	7,455	0,999
0,200	8,576	1,703	4,454	0,640	0,502	9,117	0,974
0,250	9,680	1,884	1,671	0,626	2,721	9,809	0,999

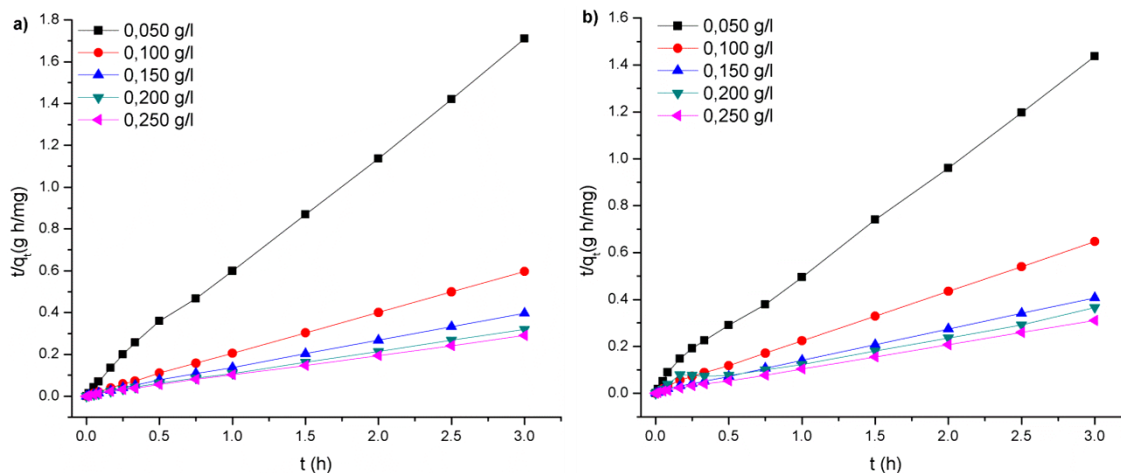
K.B.: Početna koncentracija boje kristal violet u reakcionoj smeši;

* : q_e , eksperimentalno;

** : q_e , modelovano.

Kinetički parametri adsorpcije boje izračunati su iz vrednosti nagiba i odsečaka linearizovanih oblika modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, a rezultati su prikazani u **tabeli 6.1**. Analizirano je, kako slaganje vrednosti između dobijenih eksperimentalnih i teorijski predviđenih ravnotežnih kapaciteta adsorpcije, $q_{e,(eks/mod)}$, tako i slaganje izračunatih koeficijenata korelacije, R^2 . U vezi s tim, pronađeno je da bi se kinetika adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance mogla najbolje aproksimirati modelom pseudo-drugog reda.

Koeficijenti linearne regresije (R^2) modela pseudo-drugog reda, na celokupnom ispitanom opsegu koncentracija boje, bili su bliski jedinici kod primene oba adsorbenta, što upućuje na dobro slaganje eksperimentalnih vrednosti sa ovim kinetičkim modelom. Nakon upoređivanja dobijenih eksperimentalnih i teorijski predviđenih vrednosti adsorpcionih kapaciteta modelom, potvrđene su njihove veoma bliske vrednosti uz neznatna odstupanja, što nije bio slučaj i kod modela pseudo-prvog reda. U vezi s tim, model pseudo-drugog reda bolje opisuje kinetiku procesa adsorpcijeboje KV na oba adsorbenta, što je i grafički predstavljeno na **slici 6.5**.



Slika 6.5. Kinetika adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane (a) i aktivirane (b) repine rezance po modelu pseudo-drugog reda

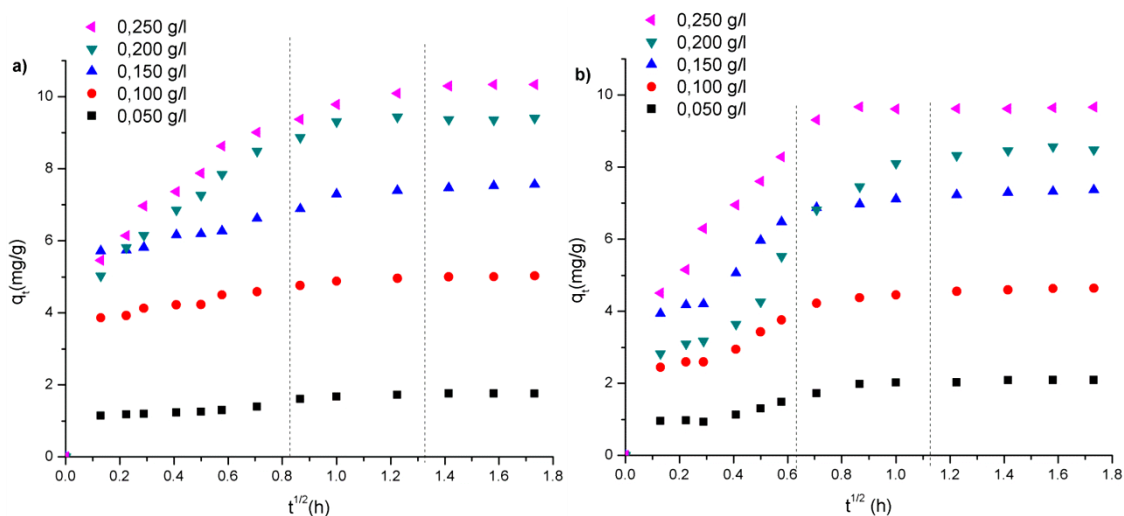
Adsorpcioni sistem se pokorava kinetičkom modelu pseudo-drugog reda za celokupni eksperimentalni period i na taj način podržava pretpostavku, koja stoji iza ovog

modela, da se adsorpcija dešava usled hemisorpcije. Dakle, hemisorpcija je ta koja predstavlja korak koji kontroliše brzinu adsorpcije boje na adsorbentima [20]. Adosorpcija boje na neaktivirane/aktivirane repine rezance se verovatno odvija preko površinskih reakcija deljenja ili razmene, sve dok sva aktivna mesta površine adsorbenta ne budu potpuno okupirana. Nakon toga, molekuli boje difunduju u polimernu mrežu poroznog adsorbenta za dalju interakciju i/ili reakciju (kompleks inkluzije, vezivanjem vodonika, hidrofobne interakcije) [47, 164].

Raniji literaturni podaci takođe potvrđuju da se kinetika adsorpcije katjonskih boja na neaktivirane repine rezance zasniva po modelu pseudo-drugog reda [7, 20]. Međutim, zapažena je i situacija da se kinetika adsorpcije boje bazne violet 16 na neaktivirane repine rezance pokorava i kinetičkom modelu pseudo-prvog i pseudo-drugog reda [1]. Kada je reč o adsorpciji katjonskih boja na aktivirane repine rezance, tačnije aktivnom uglju od otpadnih repinih rezanaca, situacija je identična [2]. Što se tiče adsorpcije boje KV na drugim agroindustrijskim otpadnim materijalima i aktivnom uglju koji je dobijen od istih, adsorpcioni sistem se takođe pokorava kinetičkom modelu pseudo-drugog reda kao u slučaju primene otpadnih repinih rezanaca [21, 70].

Mehanizam procesa adsorpcijeboje na neaktivirane/aktivirane repine rezance dalje je analiziran ispitivanjem slaganja eksperimentalnih rezultata sa modelom međučestične difuzije. Ukoliko u procesu dolazi do međučestične difuzije, onda će grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ biti linearan i ukoliko kriva na grafiku prolazi kroz koordinantni početak onda je međučestična difuzija jedini korak koji kontroliše proces. Ukoliko to nije slučaj, smatra se da i neki drugi mehanizam ima udela u ograničavanju toka reakcije [2]. Grafici zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ prikazani su na **slici 6.6**.

Sa grafika se može uočiti da je proces adsorpcije boje na oba adsorbenta multilinearni proces koji se odigrava u tri faze (**slika 6.6**). U prvoj fazi, oštrijem delu grafika, na samom početku reakcije dolazi do difuzije boje kroz vodeni rastvor do spoljašnje površine adsorbenta ili graničnog sloja oko čestica adsorbenata. Druga faza, koja je linearnija, je faza adsorpcije i opisuje postepeno formiranje sloja i u kojoj je stopa međučestične difuzije ograničena.



Slika 6.6. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane (a) i aktivirane (b) repine rezance

Dakle, tokom ove prve dve faze dolazi do spontane adsorpcije kao posledice elektrostatičkih interakcija između molekula boje KV i površine neaktiviranih/aktiviranih repinih rezanaca. Poslednja, treća faza, je sporija, traje sve do kraja reakcije i njoj se pripisuje ravnotežna faza procesa adsorpcije tokom koje usporava međučestična difuzija zbog niske koncentracije boje u reakcionoj smeši. Pošto nagibi kriva različitih koncentracija (**slika 6.6.**) ne prolaze kroz koordinatni početak, ukazuje se na izvestan stepen kontrole graničnog sloja, što dalje pokazuje da međučestična difuzija nije jedini kontrolišući korak koji opisuje proces adsorpcije. Do sličnih rezultata sa ovim istraživanjem, došli su i Malekbala (*Malekbala*) i saradnici (2012) [7], koji su primetili da su dva ili više koraka uključena u mehanizam adsorpcije katjonskih boja (metilensko plavo i safranin) na neaktivirane repine rezance.

Konstante međučestične difuzije i efekat graničnog sloja pri različitim koncentracijama boje, izračunate su iz nagiba i odsečka krive zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ i prikazane su u **tabeli 6.2.**

Tabela 6.2. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

K.B.	k_{ID1}^*	C_1	R_1^2	k_{ID2}^*	C_2	R_2^2	k_{ID3}^*	C_3	R_3^2
<i>Neaktivirani repini rezanci</i>									
0,500	0,391	1,084	0,925	0,325	1,331	0,937	-0,017	1,784	0,199
0,100	1,277	3,690	0,938	0,522	4,327	0,839	0,094	4,863	0,823
0,150	1,588	5,432	0,942	1,321	5,829	0,561	0,319	7,018	0,968
0,200	5,854	4,406	0,994	1,483	7,675	0,629	0,112	9,196	-0,068
0,250	6,167	4,856	0,970	1,947	7,745	0,897	0,133	10,116	0,389
<i>Aktivirani repini rezanci</i>									
0,500	1,213	0,699	0,826	1,030	1,022	0,775	0,120	1,893	0,561
0,100	2,972	1,907	0,906	0,799	3,664	0,973	0,165	4,359	0,908
0,150	5,977	2,849	0,923	0,816	6,287	0,955	0,259	6,917	0,968
0,200	5,452	1,817	0,827	4,416	3,670	0,995	0,368	7,909	0,413
0,250	8,373	3,497	0,975	1,072	8,612	0,308	0,093	9,502	0,692

K.B.: Početna koncentracija boje kristal violet u reakcionoj smeši (g/l);

*: $\text{mg/g}\cdot\text{h}^{1/2}$.

Sa porastom početne koncentracije boje u rastvoru, rastu i ove dve mehaničke konstante. Njihove vrednosti su pritom i pozitivne, što ukazuje da se adsorpcija na neaktivirane/aktivirane repine rezance odigrala u relativno kratkom vremenskom periodu. Postoji verovatnoća da je došlo do reverzne difuzije boje (0,050 g/l), iz pravca površine neaktiviranih repinih rezanaca u rastvor, u momentu kada su slobodna mesta adsorbenta bila popunjena [165]. S obzirom da k_{ID3} (0,050 g/l) ima relativno malu vrednost, ova desorpcija se ne može smatrati značajnom.

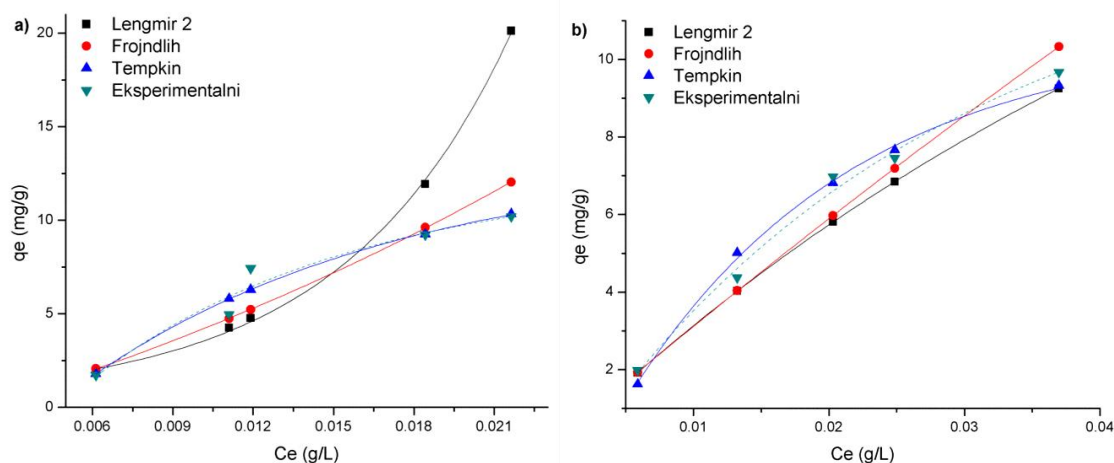
6.1.4. Adsorpcione izoterme

Ravnotežni uslovi adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance, analizirani su korišćenjem sledećih modela izotermi: Lengmirovog, Frojndlihovog i Tempkinovog. Grafički su prikazane na **slici 6.7.**, a u **tabeli 6.3.** se nalaze vrednosti odgovarajućih ravnotežnih konstanti.

Tabela 6.3. Ravnotežni parametri adsorpcionih izoterma boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

Lengmir			Frojdlih			Tempkin		
R_L^2	K_L (l/mg)	q_m (mg/g)	R_F^2	n	K_F (mg/g)(l/g) ⁿ	R_T^2	k_{1T}	k_{2T} (l/mg)
<i>Neaktivirani repini rezanci</i>								
0,912	-1,618	-6,850	0,882	0,716	0,164	0,944	6,488	0,028
<i>Aktivirani repini rezanci</i>								
0,943	0,010	33,380	0,958	1,027	0,122	0,972	4,899	0,250

Posmatrajući grafičke prikaze adsorpcionih izoterma (slika 6.7.), pri ravnotežnim uslovima procesa adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance, može se uočiti da je priroda ovih procesa bila identična.



Slika 6.7. Adsorpcione izoterme procesa adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane (a) i aktivirane (b) repine rezance (25 °C)

Prvi nagoveštaj, koji ukazuje na nekompatibilnost modela sa aktuelnim sistemom, je primanje konkavnog oblika krive. Kod adsorpcije na neaktivirane repine rezance, Lengmirova izoterma je primila ovakav konkavan oblik, što za posledicu ima negativni predznak izračunatih vrednosti ravnotežnih konstanti. U vezi s tim, može se isključiti pretpostavka da je tokom procesa adsorpcije boje došlo do postizanja ravnoteže formiranjem monosloja čestica adsorbata na homogenoj površini neaktiviranih/aktiviranih

repinih rezanaca. Ne postoji tačno definisan broj lokalizovanih adsorpcionih mesta na adsorbentu, a energetska stanje svih adsorbovanih molekula boje je bilo identično, bez obzira na položaj u prostoru ili stanje susednog adsorpcionog mesta [104, 163].

Preostale dve krive, u oba slučaja, bile su pretežno ravnog (Frojdliih) ili konveksnog (Tempkin) oblika. Dakle, može se isključiti i pretpostavka da su na površini adsorbenata raspoređena energetska heterogena aktivna mesta, na kojima dolazi do formiranja više slojeva čestica adsorbata [3, 166]. Imajući u vidu koeficijente korelacije, R^2 , Tempkinova izoterma je pokazala najbolje slaganje sa eksperimentalnim rezultatima. U vezi s tim, može se pretpostaviti da je na aktivnoj površini oba adsorbenta dominirala uniformna raspodela energije vezivnih mesta. Sa porastom debljine sloja adsorbovanih molekula boje KV dolazi i do linearnog opadanja i smanjenja energije adsorpcije. Ovakva pojava smanjenja energija adsorpcije je posledica indirektnih adsorbat/adsorbat interakcija, dok je samo odigravanje procesa bilo olakšano, na šta upućuju i izračunate vrednosti Tempkinove energetske konstante b od 373,901 i 495,136 J/mol redom kod neaktiviranih i aktiviranih repinih rezanaca [22].

U literaturi je prethodno zabeleženo da je adsorpcija katjonskih boja na neaktivirane repine rezance bila, najčešće, u skladu sa Lengmirovom adsorpcionom izotermom [7, 20]. Međutim, adsorpcija boje bazne violet 16 na neaktivirane repine rezance se pokazala da je u skladu i sa Lengmirovom i Frojdliihovom adsorpcionom izotermom [1]. Slično adsorpciji katjonskih boja, i adsorpcija drugih vrsta boja na neaktivirane i modifikovane optadne repine rezance, kao i aktivnog uglja dobijenog od ovog materijala, bila je aproksimirana Lengmirovim ravnotežnim modelom [2, 167, 168].

6.1.5. Optimizacija procesa adsorpcije korišćenjem metodologije odzivne površine

6.1.5.1. Postavljanje modela eksperimenta

Za optimizaciju procesa adsorpcije i statističku obradu podatka korišćen je softver Design Expert 8. U matrici BBD adsorpcije boje na neaktivirane/aktivirane repine rezance, posmatrana su dva izlazna parametra: adsorpcioni kapacitet (Y_1 , mg/g) i procenat

uklanjanja boje (Y_2 , %). Vrednosti dobijenih odziva, na osnovu eksperimentalnih podataka, predstavljene su u prilogu 2 **tabelom P-2.1**. Variranjem ulaznih procesnih parametara na različitim nivoima simultano, opisani su njihovi interaktivni efekti, kao i ukupan efekat na proces.

Vrednosti adsorpcionog kapaciteta i procenta uklanjanja boje KV neaktiviranim repinim rezancima, kretale su se redom od 1,088 mg/g do 21,951 mg/g i od 51,355 % do 97,923 %. Što se tiče adsorpcije na aktivirane repine rezance, vrednosti ovih izlaznih parametara kretale su se od 1,055 mg/g do 28,863 mg/g i od 40,139 % 85,814 %. Upoređivanjem adsorpcionih kapaciteta ove dve vrste adsorbenata od repinih rezanaca, može se uočiti da je mikrotalasna aktivacija pozitivno delovala na modifikaciju površine adsorbenta i poboljšala sorpcione karakteristike aktiviranih repinih rezanaca. Međutim, upoređivanjem procenata uklanjanja boje KV, mikrotalasna aktivacija je imala suprotan efekat na aktivirane repine rezance i uticala na smanjenje ovog odziva.

6.1.5.2. Ocena značajnosti modela i ulaznih procesnih parametara

Analiza varijanse (ANOVA) eksperimentalno dobijenih rezultatata dala je ocenu značajnosti odziva i procesnih promenljivih kvadratnih modela procesa adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance. Statistička analiza modela predstavljena je **tabelama 6.4. i 6.5.**

U celini, svi regresioni modeli su statistički značajani, jer su i njihove F-vrednosti sa veoma niskim p-vrednostima pokazale veoma visok statistički značaj ($\text{Prob}>F=<0,0001$). Takođe, odzivi se mogu dobro opisati predviđenim jednačinama jer vrednosti nedostatka fitovanja modela nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Statistički parametar nedostatka fitovanja (eng. *Leak of fit*) daje procenu da li su kontrolne eksperimentalne vrednosti pravilno raspoređene oko odgovarajuće srednje vrednosti modela. Da bi se testiralo uklapanje modela sa dobijenim eksperimentalnim vrednostima, procenjuju se regresione jednačine i određuju se koeficijenti regresije (**tabela 6.4.**).

Tabela 6.4. Analiza varijanse odziva eksperimentalnog dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

Izvor	R ²	F vrednost	p-vrednost prob>F	K.V.	A.P.
Y _{1N}	0,998	464,598	<0,0001 ^z	4,041	77,200
Leak of fit *		3,384	0,1257 ⁿ		
Y _{2N}	0,986	70,469	<0,0001 ^z	2,243	35,993
Leak of fit		0,394	0,8943 ⁿ		
Y _{1A}	0,994	163,840		8,521	55,460
Leak of fit		4,182	0,0902 ⁿ		
Y _{2A}	0,923	12,004	<0,0001 ^z	8,427	13,256
Leak of fit		2,613	0,1838 ⁿ		

Y_{1N}/Y_{1A}: Adsorpcioni kapacitet neaktiviranih/aktiviranih repinih rezanaca;

Y_{2N}/Y_{2A}: Procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim repinim rezancima;

K.V.: Koeficijent varijacije (%);

A.P.: Adekvatna preciznost;

*: Nedostatak fitovanja (*Leak of fit*);

^z: Značajan;

ⁿ: Nije značajan.

Za potrebe regresione analize, posmatrani model se modifikuje i redukuje odbacivanjem faktora koji nisu značajni, jer je njihova vrednost Prob>F veće od 0,05 (tabela 6.5.). Na taj način, dobija se polinomalna jednačina drugog reda kojom se najbolje opisuje odziv procesa adsorpcije boje. Pozitivni predznak regresionih koeficijenata ukazuje na linearne, kvadratne i međusobne efekte nezavisnih promenljivih koje mogu da povećaju odziv (ispoljavaju sinergistički efekat na odziv), dok se negativni predznak odnosi na njihov antagonistički efekat.

Višestruka regresiona analiza eksperimentalnih podataka dala je sledeće polinomalne jednačine drugog reda:

$$\begin{aligned}
 Y_{1N} = & 8,17 - 5,55 \times A + 5,18 \times B + 0,79 \times C - 1,34 \times D - 3,22 \times AB - 2,12 \times AC \\
 & + 2,81 \times AD + 0,64 \times BC - 1,18 \times BD - 2,38 \times CD + 2,50 \times A^2 - 2,43 \\
 & \times B^2 + 1,79 \times C^2 + 1,52 \times D^2
 \end{aligned} \tag{8.1}$$

$$\begin{aligned}
 Y_{2N} = & 81,71 + 7,97 \times A - 5,97 \times B + 9,99 \times C + 2,26 \times AD - 2,08 \times BD - 5,02 \times A^2 \\
 & + 5,27 \times B^2 - 5,67 \times C^2 - 1,15 \times D^2
 \end{aligned} \tag{8.2}$$

$$Y_{1A} = 7,32 - 5,83 \times A + 5,51 \times B + 2,27 \times C - 6,18 \times AB - 1,47 \times AC + 1,05 \times AD + 2,13 \times BC + 3,44 \times A^2 - 0,68 \times C^2 \quad (8.3)$$

$$Y_{2A} = 73,23 + 9,84 \times A + 17,15 \times C - 8,29 \times C^2 \quad (8.4)$$

pri čemu su Y_{1N}/Y_{1A} predviđeni odzivi za adsorpcioni kapacitet neaktiviranih/aktiviranih repinih reznaca, Y_{2N}/Y_{2A} predviđeni odzivi za procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim repinim rezancima, a A, B, C i D su procesne promenljive (tabela 5.1).

Tabela 6.5. Analiza varijanse procesnih parametara eksperimentalnog dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

Faktori	prob>F			
	Y_{1N}	Y_{2N}	Y_{1A}	Y_{2A}
A	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z
B	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,1100
C	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z
D	<0,0001 ^z	<0,0594	<0,5566	<0,8356
AB	<0,0001 ^z	<0,7519	<0,0001 ^z	<0,9530
AC	<0,0001 ^z	<0,2466	<0,0009 ^z	<0,6379
AD	<0,0001 ^z	<0,0231 ^z	<0,0095 ^z	<0,4515
BC	<0,0053 ^z	<0,5281	<0,0001 ^z	<0,1691
BD	<0,0001 ^z	<0,0341 ^z	<0,1040	<0,9704
CD	<0,0001 ^z	<0,5447	<0,4634	<0,4826
A ²	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,1298
B ²	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,9308	<0,8534
C ²	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0269 ^z	<0,0022 ^z
D ²	<0,0001 ^z	<0,1203	<0,0352 ^z	<0,3128

Y_{1N}/Y_{1A} : Adsorpcioni kapacitet neaktiviranih/aktiviranih repinih reznaca;

Y_{2N}/Y_{2A} : Procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim repinim rezancima;

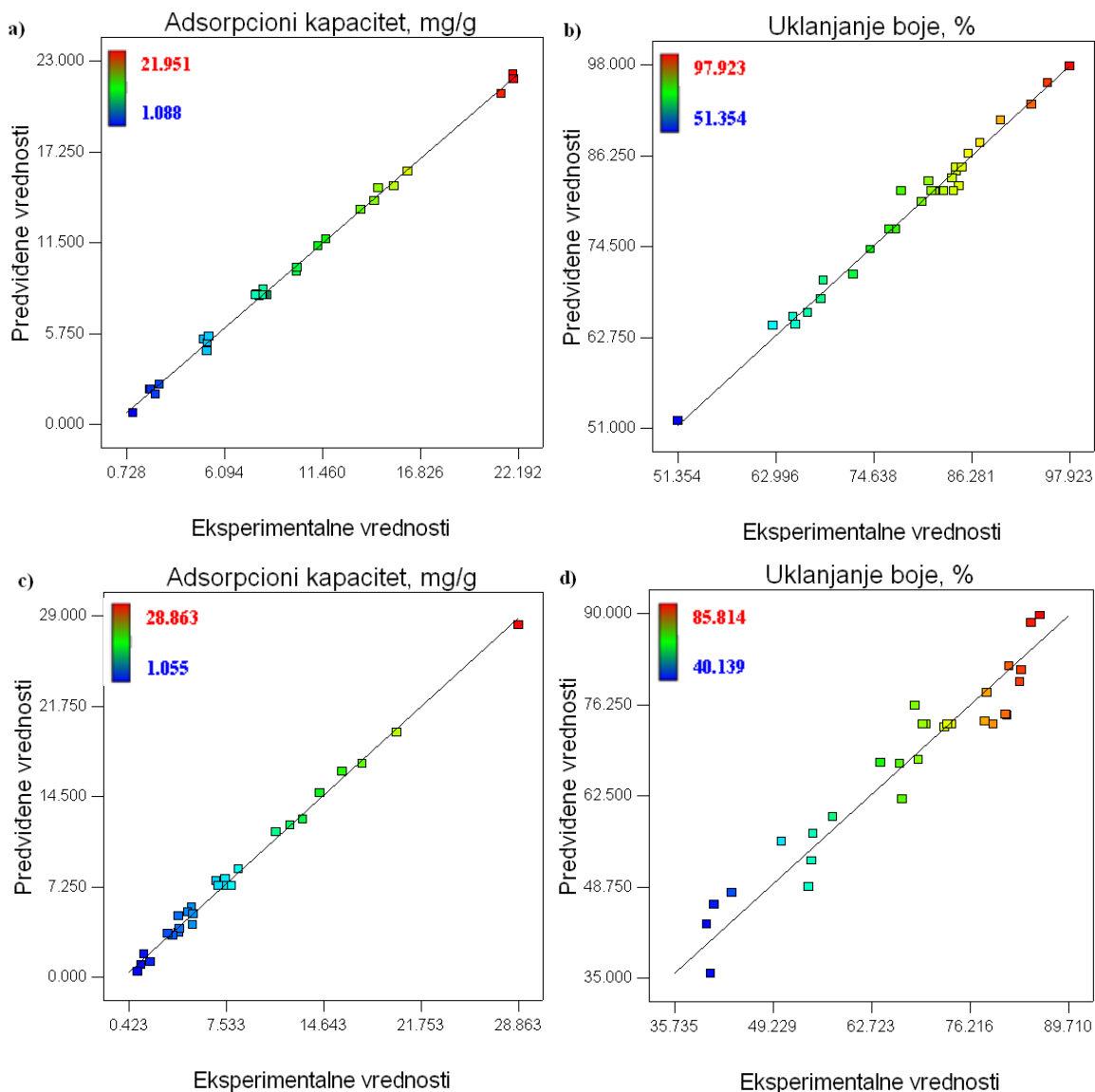
A: Količina adsorbenta;

B: Početna koncentracija boje;

C: Vreme trajanja procesa;

D: Početna pH rastvora boje;

^z: Značajan.



Slika 6.8. Slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti odziva eksperimentalnog dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane (a-b) i aktivirane (c-d) repine rezance

U svim slučajevima, bile su visoke vrednosti koeficijenta korelacije R^2 (veoma bliske jedinici), što ukazuje na dobru korelaciju između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti odziva, kao i da se većina podataka uklapa u zadati regresioni model. Istovremeno, relativno niske vrednosti koeficijenta varijacije (K.V., %), ukazuju na bolju preciznost i pouzdanost izvršenih eksperimenata, odnosno reproduktivnost modela (K.V. < 10 %, **tabela 6.4.**). Najviša vrednost R^2 -a bila je za odziv adsorpcioni kapacitet na

neaktivirane repine rezance (Y_{1N}), a najniža za odziv procenat uklanjanja boje aktiviranim repinim rezancima (Y_{2A}), što istovremeno ukazuje da za ovaj odziv (Y_{2A}) postoji najlošija korelacija između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti (**Slika 6.8.(a-d)**).

Urađena je validacija modela u cilju potvrde reproduktivnosti predstavljenog dizajna. Odabranesu, nasumično, po dve tačke, iz numeričke optimizacije od ukupno trideset koliko ih je ponudio softverski paket, za svaki odziv model adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance. Dobijene su bliske vrednosti predviđenih i validiranih rezultata za oba odziva, čime je potvrđena mogućnost primene prethodno predloženog dizajna (**Tabela 6.6.**).

Tabela 6.6. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

Faktori				Odzivi			
A	B	C	D	Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano
g/l	g/l	s		Y_1 (mg/g)		Y_2 (%)	
<i>Neaktivirani repini rezanci</i>							
14	0,250	600	3,01	21,951	21,833	86,753	86,474
13,6	0,250	600	3,23	21,951	22,035	86,338	86,417
<i>Aktivirani repini rezanci</i>							
7,4	0,250	600	4,06	28,863	28,229	78,983	78,762
8,5	0,250	600	3,01	26,585	26,669	80,325	80,762

A: Količina adsorbenta;

B: Početna koncentracija boje;

C: Vreme trajanja procesa;

D: Početna pH rastvora boje;

Y_1 : Adsorpcioni kapacitet;

Y_2 : Procenat uklanjanja boje.

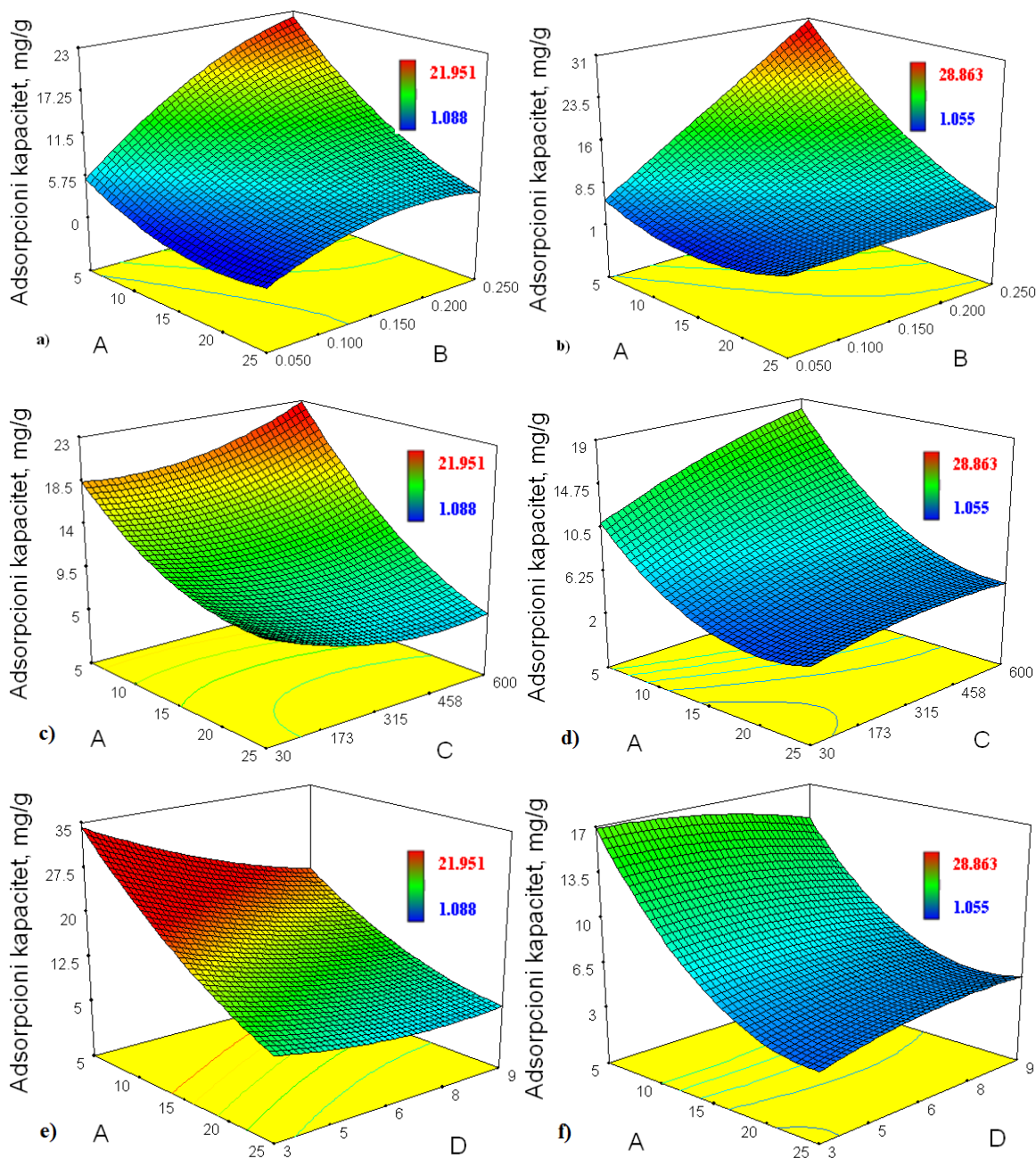
6.1.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet

Na osnovu ANOVA statistike za adsorpcioni kapacitet na neaktivirane repine rezance (**tabela 6.5.**), pokazano je da su pojedinačni i interaktivni efekti svih procesnih parametara statistički značajno uticali na ponašanje odziva u posmatranom sistemu. Kod primene aktiviranih repinih rezanaca, statistički nisu bili značajni sledeći efekti:

pojedinačni efekat parametra D, interaktivni efekti parametara B/D, C/D i B². Uticaji nekih od značajnih interaktivnih efekata ispitivanih procesnih parametara, na promene adsorpcionog kapaciteta boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance, prikazani su i grafički na **slici 6.9.(a-f)**. Vrednosti ostalih procesnih parametara su postavljene na njihove srednje vrednosti. Kod primene neaktiviranih repinih rezanaca za uklanjanje boje KV iz vodenih rastvora, maksimalni adsorpcioni kapacitet je postignut pri: količini adsorbenta od 5 g/l, početne koncentracije boje od 0,150 g/l, vremena trajanja procesa od 315 s i početne pH rastvora boje 3 (**tabela P-2.1.**, eksperiment 9). Što se tiče maksimalnog adsorpcionog kapaciteta boje na aktivirane repine rezance, postignut je sa istom količinom adsorbenta i istim vremenom trajanja procesa, dok su razlike bile u početnoj koncentraciji boje (0,250 g/l) i početnoj pH vrednosti rastvora boje od (pH 6) (**tabela P-2.1.**, eksperiment 3).

Posmatrajući grafike interaktivnih odnosa procesnih parametara vreme trajanja procesa (C) i početne pH rastvora boje (D) sa količinom adsorbenta (A), može se primetiti da se sa smanjenjem početne količine adsorbenta raste adsorpcioni kapacitet boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance (**Slika 6.9.(a-f)**). Tokom procesa adsorpcije, pri manjim količinama adsorbenta, ne dolazi do pojave nezasićenih adsorpcionih mesta na površini adsorbenata. Kada je prisutna veća količina adsorbenta u sistemu, tada može doći ili do preklapanja ili do agregacije adsorpcionih lokacija usled prenatrpanosti adsorbenta u radnom sistemu. Na taj način smanjuje se i ukupna adsorpciona površina adsorbenta koja je na raspolaganju adsorbatu i povećava se dužina putanje difuzije molekula boje [169, 170]. Količina adsorbenta smatra se jednim od najvažnijih procesnih parametara procesa adsorpcije svih hemijskih vrsta. Njime se određuje potencijal primenjenog adsorbenta da ukloni adsorbat iz rastvora. Koliko je ovaj procesni parametar značajan govori i činjenica da su i svi efekti, pojedinačni i interaktivni u kojima učestvuje parametar A, bili statistički značajni za odziv Y₁ (adsorpcioni kapacitet) primenom neaktiviranih i aktiviranih repinih rezanaca za izdvajanje boje KV iz rastvora.

Na adsorpcioni kapacitet, početna koncentracija boje (B) u sistemu pokazala je obrnuti efekat u odnosu na količinu adsorbenta (A) (**Slika 6.9.(a-b)**). Sa porastom početne koncentracije boje raste i adsorpcioni kapacitet boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance.



Slika 6.9. 3D grafik interaktivnih efekata količine adsorbenta (A) i: koncentracije boje (B) (a-b), vremena trajanja procesa (C) (c-d) i početna pH rastvora boje (D) (e-f) na adsorpcioni kapacitet boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

U procesu adsorpcije boje, molekuli boje se prvobitno susreću sa efektom graničnog sloja, a potom moraju da difunduju iz filma graničnog sloja na površinu adsorbenta, da bi na kraju difundovali u poroznu strukturu oba adsorbenta [170]. Za sve

navedene korake, potrebna je pokretačka sila koja je sposobna da prevaziđe sve prepreke tokom prenosa molekula boje iz tečne u čvrstu fazu. Ova snaga, dakle, potiče od početnog gradijenta koncentracije boje u rastvoru [171]. Ukoliko je početna koncentracija boje veća, veća je i pokretačka sila, a samim tim će i konačno veća količina boje završiti na površini adsorbenta. Takođe, proces adsorpcije boje se lakše odigrava i unapređen je kada su adsorpciona mesta okružena sa većim brojem molekula adsorbata [172].

Uticao ova dva procesna parametra, količine adsorbenta i početne koncentracije boje, na proces adsorpcije katjonskih boja, zapažen je i ranije u literaturi [7, 21, 173]. Maksimalni adsorpcioni kapacitet katjonske boje bazna violet 16 na neaktivirane repine rezance je 13,6 mg/g [1], što je niža vrednost od dobijenog adsorpcionog kapaciteta boje KV na neaktivirane repine rezance u ovom istraživanju. Za razliku od ove dve katjonske boje, Malekbala (*Malekbala*) i saradnici (2012) su za adsorpcioni kapacitet metilensko plave i safranin boje na repine rezance dobili daleko veće vrednosti, i to redom od 211 mg/g i 147 mg/g [7].

Vreme trajanja kontakta (C) između čestica adsorbata i adsorbenta se, takođe, pokazala kao značajna procena promenljiva za adsorpcioni kapacitet boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance (**Slika 6.9.(c-d)**). Svi individualni i interaktivni efekti sa ovim procesnim parametrom su statistički značajni za odziv, izuzev interaktivnog efekta (C/D) vremena trajanja procesa (C) i početne pH rastvora boje (D) kod primene aktiviranih repinih rezanaca. Sa porastom vremena trajanja procesa adsorpcije raste i adsorpcioni kapacitet boje na adsorbentima. Pri istom trajanju kontakta između dve faze (315 s), postignuti su maksimalni adsorpcioni kapaciteti od 21,951 mg/g za neaktivirane i 28,863 mg/g za aktivirane repine rezance. Adsorpcioni kapaciteti za boju metilensko plavo (katjonska boja) na neaktivirane repine rezance u trajanju od oko 15 min, bili su niži i kretali su se od oko 1 mg/g do oko 5 mg/g (koncentracija boje 0,020-0,050 g/l, količina adsorbenta 6,670 g/l, pH 2-8) [20]. Ali adsorpcioni kapacitet za safranin bio je veći i kretao se od 21,696 mg/g do 64,329 mg/g za koncentracije boje 0,010-0,030 g/l u trajanju od oko 90 min (količina adsorbenta 80 g/l i pH 10) [7].

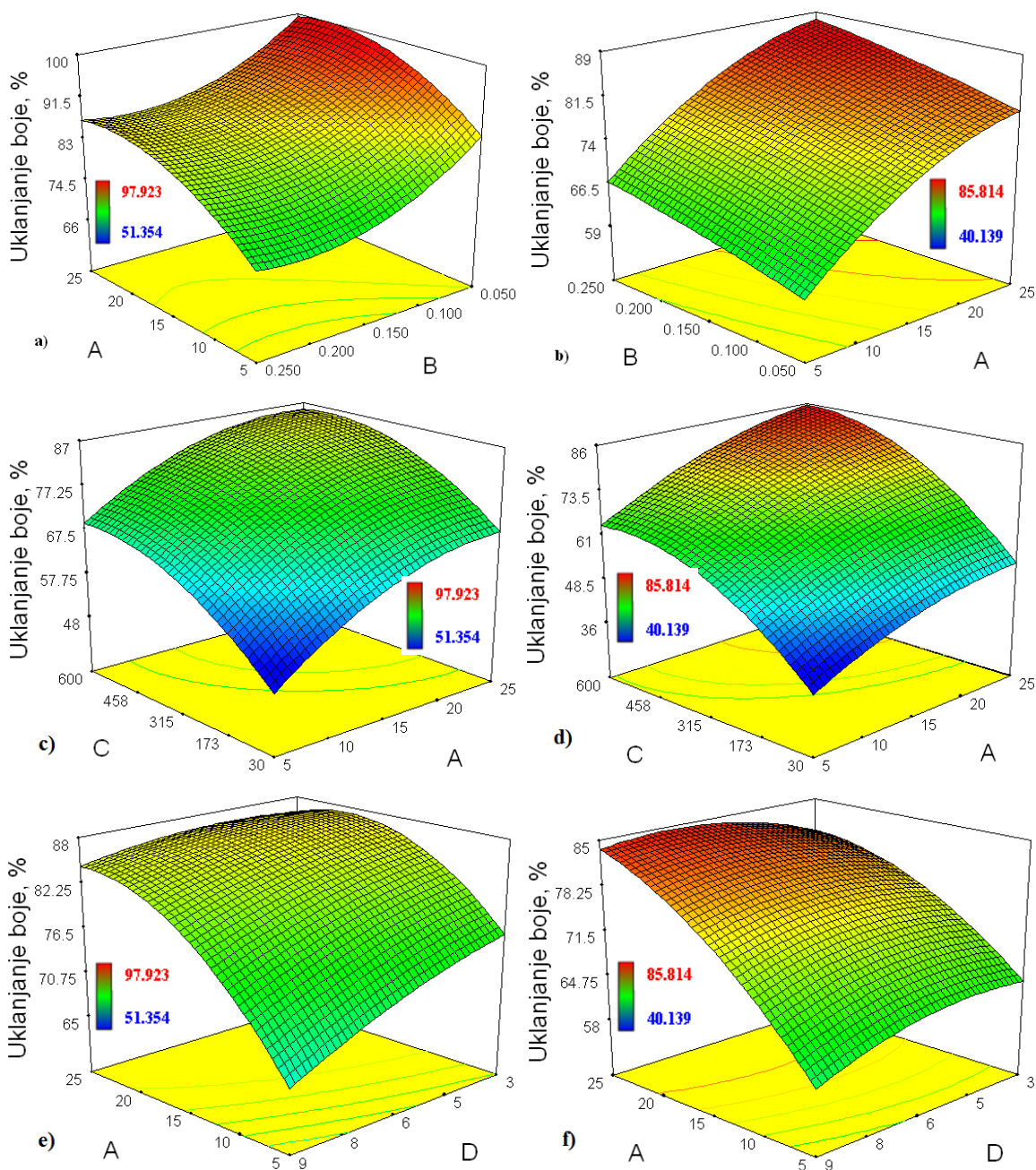
Adsorpcioni kapaciteti bili su u porastu u uslovima povećanja početne pH rastvora boje pri najvećoj količini oba adsorbenta u sistemu (**Slika 6.9.(e-f)**). Pri najmanjoj količini

adsorbenata, sa opadanjem početnog pH rastvora boje dolazi do povećanja adsorpcionog kapaciteta. Ove promene, u slučaju aktiviranih repinih rezanaca, bile su neznatne. U prilog ovome ide i to što je efekat početne pH rastvora boje (D) na adsorpcioni kapacitet boje KV na aktivirane repine rezance bio statistički neznačajan (**tabela 6.5.**). Nije retkost u literaturi da je adsorpcija boja na repine rezance bila nezavisna od početne pH rastvora, što je doprinelo specifičnoj strukturi samog materijala [1].

6.1.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjene boje iz rastvora

Značajnost procesnih parametara na odziv procenta uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim repinim rezancima se, u velikoj meri, razlikovala (**tabela 6.6.**). ANOVA statistika je pokazala da su na procenat uklanjanjaboje KV aktiviranim repinim rezancima bili značajni samo pojedinačni efekti količine adsorbenta (A) i pojedinačan i interaktivan efekat vremena trajanja procesa (C, C²). Kod primene neaktiviranih repinih rezanaca, statistički je bio značajan veći broj efekata: pojedinačan i svi interaktivni efekti parametra količine adsorbenta (A), pojedinačan i interaktivan efekatpočetne koncentracije boje (B, B/C), kao i pojedinačan i interaktivan efekatvremena trajanja procesa (C, C²). Uticaji interaktivnih efekata količine adsorbenta sa početnom koncentracijom boje i vremenom trajanja procesa, na promene procenta uklanjanja boje KV korišćenim adsorbentima, prikazani su i grafički na **slici 6.10.(a-f)**. Vrednosti ostalih procesnih promenljivih, tom prilikom, postavljene su na njihovie srednje vrednosti.

Kod primene neaktiviranih repinih rezanaca, maksimalni procenat uklanjanja boje KV je postignut pri: količini adsorbenta od 15 g/l, početne koncentracije boje od 0,500 g/l, vremena trajanja procesa od 600 s i početne pH rastvora boje od 6 (**tabela P-2.1., eksperiment 2**). Što se tiče maksimalnog procenta uklanjanja boje na aktiviranim repinim rezancima, postignut je pri istom trajanju procesa i početne pH rastvora boje, dok su razlike bile u količini adsorbenta od 25 g/l i početne koncentracije boje od 0,150 g/l (**tabela P-2.1., eksperiment 20**).



Slika 6.10. 3D grafik interaktivnih efekata količine adsorbenta (A) i: koncentracije boje (B) (a-b), vremena trajanja procesa (C) (c-d) i početne pH rastvora boje (D) (e-f) na procenat uklanjanja boje kristal violet neaktiviranim/aktiviranim repinim rezanacima

Posmatranjem grafika interaktivnih efekata ispitivanih procesnih parametara na efikasnost uklanjanja boje KV iz vodenih rastvora, može se uočiti da sa porastom količine

adsorbenta u sistemu raste i procenat uklanjanja boje (**slika 6.10.(a-f)**). Povećanje efikasnosti uklanjanja boje sa povećanjem količine adsorbenta se pripisuje povećanju adsorpcione površine i većem broju aktivnih mesta, a samim tim i većem broju aktivnih funkcionalnih grupa [162]. Ovakvo ponašanje, da sa povećanjem količine adsorbenta raste i procenat uklanjanja boja, zabeleženo je i ranije u literaturi adsorpcije katjonskih boja [7, 162].

U svome istraživanju adsorpcije katjunske boje (bazna violet 16) na neaktivirane repine rezance (veličina čestica 300-600 μm), Harifi-Mod i Hadavand-Mirzai (*Harifi-Mood i Hadavand-Mirzaie*) (2015) dobili su maksimalni procenat uklanjanja boje od 85,200 % (količina adsorbenta 10 g/l, koncentracija boje 0,010-0,025 g/l, pH 4) [1]. Ova vrednost je za oko 13 % niža u odnosu na dobijeni maksimalni procenat uklanjanja katjunske boje KV u ovom istraživanju (količina adsorbenta 25 g/l, koncentracija boje 0,050 g/l, pH 6, **slika 6.10.a**).

Pored količine adsorbenta i vreme trajanja kontakta (C) između čestica adsorbata i adsorbenta se pokazalo kao značajna procesna promenljiva efikasnosti uklanjanja boje KV kod primene oba adsorbenta. Sa porastom vremena trajanja procesa značajno raste i procenat uklanjanja boje iz rastvora (**slika 6.10.(c-d)**). Ovo se uklapa i sa činjenicom da je zadati vremenski opseg bio kraći od vremena potrebnog da se uspostavi termodinamička ravnoteža adsorpcije KV boje na neaktivirane/aktiviranerepine rezance. Takođe, maksimalna efikasnost uklanjanja boje, za oba adsorbenta, postignuta je za isto vreme trajanja procesa (600 s).

Kada se posmatra uticaj početne koncentracije boje KV (B) u rastvoru na procenat uklanjanja boje, zapaženo je antagonističko delovanje ovog parametra primenom neaktiviranih i aktiviranih repinih rezanaca (**slika 6.10.(a-b)**). Procenat uklanjanja boje aktiviranim repinim rezancima raste sa porastom početne koncentracije boje, jer sa većom količinom adsorbata raste i verovatnoća uspostavljanja kontakta između njih i adsorbenta. Ovakva zapažanja nisu retkost u literaturi uklanjanja boja iz vodenih rastvora [21]. Kod primene neaktiviranih repinih rezanaca, efikasnost uklanjanja boje raste sa smanjenjem početne koncentracije boje, jer adsorbent neće biti zasićen molekulima boje pri nižim

koncentracijama. Dursan (*Dursan*) i saradnici (2013) su došli do istih zapažanja, kao i Amin (2007), o efikasnosti uklanjanja boje iz vodenih rastvora repinim rezancima [2, 174].

Efikasnost uklanjanja boje KV iz rastvora najbolje se pokazala pri početnoj pH rastvora 6 (**slika 6.10.(e-f)**). Ovakvu početnu vrednost pH ima sam vodeni rastvor boje KV bez podešavanja. Sa porastom početne pH iznad 6 i efikasnost uklanjanja boje neznatno raste sa porastom količine oba adsorbenta u sistemu. Identično ponašanje uočeno je i tokom adsorpcije bazne violet 16 na neaktivirane repine rezance. Verovatno zbog specijalne strukture adsorbenata i nedostatka protonacije boje KV, efekat početne pH na procenat uklanjanja boje bio je zanemarljiv [1]. Svemu ovome ide u prilog i činjenica da je ova procesna promenljiva, početne pH rastvora boje (D), nije bila značajna za odziv procenta uklanjanja boje (Y_2), kod primene i neaktiviranih i aktiviranih repinih rezanaca (**tabela 6.5.**).

6.2. ADSORPCIJA KATJONSKE BOJE KRISTAL VIOLET NA PRIRODNOM ZEOLITU

Za potrebe provere uspešnosti procesa adsorpcije boje KV na adsorbentima organskog porekla, dobijenih od otpadnih repinih rezanaca, iskorišćeni su adsorbenti neorganskog tipa dobijeni od minerala zeolita. Adsorbenti su pripremljeni u skladu sa postupkom opisanom u odeljku 5.1.2., i urađena je njihova karakterizacija površine. U procesu adsorpcije na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu korišćena je ista model supstanca KV i proces je posmatran i analiziran na isti način kao kod primene adsorbenata od otpadnih repinih rezanaca.

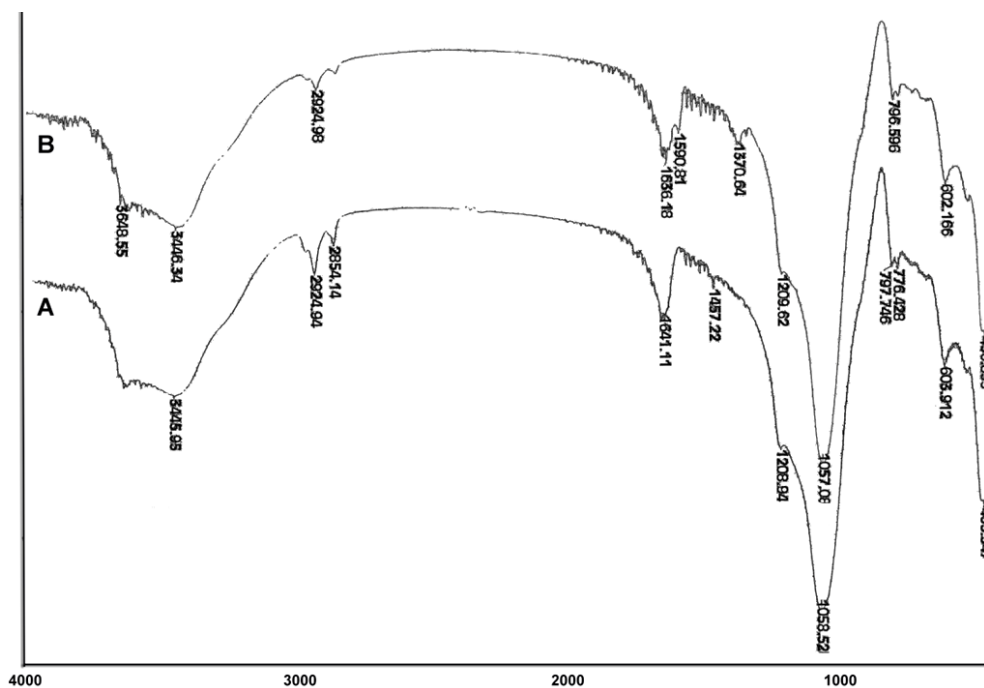
6.2.1. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenata

Karakterizacija površine adsorbenta od aktiviranog zeolita, pre i nakon procesa adsorpcije, takođe je urađena FTIR analizom, gde su određene i definisane osnovne funkcionalne grupe. Naelektrisanje površine adsorbenata određeno je pomoću tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka).

6.2.1.1. *Analiza površinskih funkcionalnih grupa pre i nakon adsorpcije boje kristal violet*

FTIR spektri adsorbenta od aktiviranog zeolita pre (spektar A) i nakon (spektar B) procesa adsorpcije boje KV prikazani su na **slici 6.11**.

FTIR spektar adsorbenta od aktiviranog zeolita pre procesa adsorpcije (spektar A) prikazuje tipičan FTIR spektar za klinoptelolit, na način kako je ranije opisan detaljno u literaturi od strane Pečara (*Pechar*) i Rikla (*Rykl*) [175]. Signal na $1,058 \text{ cm}^{-1}$ odgovara vibraciji asimetričnog istezanja unutrašnjih T–O veza u modelu tetraedra TO_4 (T = Si i Al). Vibracije Al–O i Si–O veza se ne razlikuju zbog toga što su njihove sile konstanti slične. Pomeranja signala u ovom regionu su različita za različite tipove zeolita. Ona demonstriraju različit odnos Si i Al u zeolitu. Zatim, redom signali na 798 cm^{-1} i 456 cm^{-1} predstavljaju vibracije istezanja modela O–T–O grupa i vibracije savijanja T–O veza [176].



Slika 6.11. FTIR spektri aktiviranog zeolita pre (A) i nakon (B) adsorpcije boje kristal violet

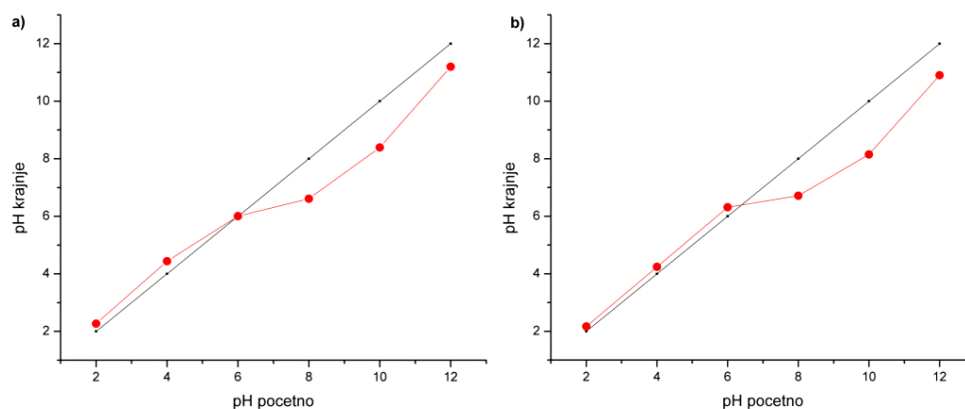
Nakon adsorpcije boje na FTIR spektru aktiviranog zeolita (spektar B) uočenu su razlike u odnosu na spektar A. Pomeranje i intenziviranje signala u regionu koji se odnosi na vibracije spoljasnih TO_4 grupa ($1,209\text{-}1,460\text{ cm}^{-1}$), kao i pojave signala koji se odnosi na vibracije savijanje H-O-H grupa u regionu $1,590\text{-}1,641\text{ cm}^{-1}$ nakon adsorpcije boje ukazuje na to da je KV boja vezana za klinoptelolit, odnosno na adsorbentu od aktiviranog zeolita.

6.2.1.2. Naelektrisanje površine adsorbenata

Određivanje tačke pH_{pzc} adsorbenata, neaktiviranog/aktiviranog zeolita, prikazano je na **slici 6.12**.

Vrednosti pH_{pzc} tačke za adsorbente od zeolita su bile dosta više nego kod adsorbenata od repinih rezanaca. Za neaktivirani zeolit iznosi 6, dok je vrednost za aktivirani zeolit bila nešto viša i iznosi oko 6,25. Na osnovu toga, za sve pH vrednosti rastvora koje su veće od 6, površina neaktiviranog zeolita biće negativno naelektrisana, dok

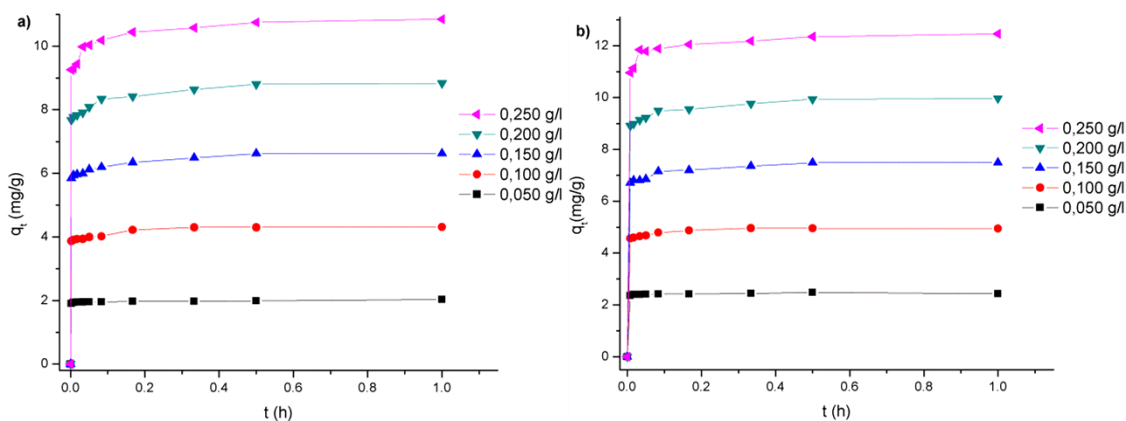
za vrednosti pH rastvora manjih od 6, preovlađivaće pozitivno površinsko naelektrisanje adsorbenta. Kod primene aktiviranog zeolita, pH rastvor boje iznad 6.25, doprineće negativnom površinskom naelektrisanju i favorizovaće adsorpciju katjonskih boja.



Slika 6.12. Određivanje tačke pH_{pzc} neaktiviranog (a) i aktiviranog (b) zeolita

6.2.2. Tok reakcije i postizanje ravnoteže

Količina boje adsorbovane po jedinici mase neaktiviranog/aktiviranog zeolita (q_e , (mg/g), u zavisnost od vremena kontakta dve faze i koncentracije boje KV, grafički je prikazana na slici 6.13.



Slika 6.13. Adsorpcijski kapaciteti boje kristal violet na neaktiviranom (a) i aktiviranom zeolitu (b) u zavisnosti od vremena kontakta

Na osnovu gore prikazanih grafika, može se uočiti da je za sve ispitane početne koncentracije rastvora KV boje, proces adsorpcije na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu jako brz proces. U toku prvih 5 minuta procesa, rastvorne čestice boje najpre započinju da difunduju kroz tečnu fazu rastvora ka površini čvrste faze aktiviranog zeolita, a potom bivaju odmah adsorbovane na njegovoj površini pošto se u njoj nalazi veliki broj dostupnih aktivnih mesta. Ovakav redosled događaja rezultira porastom količine boje na površini adsorbenta. U slučaju neaktiviranog zeolita, ova početna faza traje nešto duže, do 10 minuta, jer njegova površina nije aktivirana i manje je porozna, pa samim tim poseduje i manji broj dostupnih aktivnih mesta. U početnoj fazi procesa adsorpcije, dominantna je pojava da se molekuli boje spontano povezuju sa mnoštvom funkcionalnih grupa na aktivnoj površini adsorbenta. Ovako brza stopa adsorpcije ukazuje na pojavu takozvane trenutne ili spoljašnje adsorpcije [177]. Nakon toga, sledi sporija faza toka procesa adsorpcije, jer je broj aktivnih mesta na površini adsorbenta sada mnogo manji i mnoga mesta mogu biti teško dostupna za molekule boje (unutrašnja struktura pora adsorbenta). Na ovakvo usporavanje toka reakcije, verovatno imaju uticaj kako sile odbijanja tako i mehanički kontakti između molekula boje KV adsorbovanih na površini adsorbenta i rastvorenih u rastvoru, kao i samih molekula boje adsorbovanih u površinskom sloju [178].

Uporedo sa procesom adsorpcije, odvija se i proces desorpcije. Dakle, deo primarno adsorbovanih molekula boje se odvaja od površine čvrste faze neaktiviranog/aktiviranog zeolita i vraća natrag u tečnu fazu. Proces desorpcije postaje intenzivniji, tek kasnije, kada se već značajna količina KV boje vezala po jedinici mase adsorbenta. U određenom trenutku, doći će do izjednačenja brzine adsorpcije i desorpcije, kada će doći i do postizanja termodinamičke ravnoteže [178]. U slučaju adsorpcije na neaktiviranom zeolitu, termodinamička ravnoteža se uspostavlja relativno brzo, nakon 10 minuta. Ali, u slučaju aktiviranog zeolita, do uspostavljanja ravnoteže dolazi još brže, već nakon prvih 5 minuta odigravanja reakcije. Kako je već ranije napomenuto, za sve ispitane koncentracije jednog sistema, ravnoteža se postiže u isto vreme, ali količina adsorbovane KV boje po jedinici adsorbenta je različita. Dakle, potrebno vreme za postizanje termodinamičke ravnoteže nije zavisilo od količine molekula boje u sistemu. Međutim, adsorpcioni kapaciteti su zavisili od koncentracije boje u rastvoru. U rastvorima niske početne koncentracije (0,050 g/l),

adsorpcioni kapaciteti su bili niži. U visoko koncentrovanim rastvorima boje, usled većeg broja molekula KV boje koji se „takmiče” međusobno za dostupna aktivna mesta na površini neaktiviranog/aktiviranog zeolita, adsorpcioni kapaciteti su bili viši.

Poređenjem brzine toka reakcije adsorpcije boje KV na neaktivirane/aktivirane repine rezance i na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu, može se primetiti da su se molekuli boje KV znatno brže povezivali sa aktivnim centrima na površini adsorbenata od prirodnog zeolita. Brzina postizanja termodinamičke ravnoteže je bila oko 9 puta brža upoređivanjem neaktiviranih, odnosno aktiviranih adsorbenata.

6.2.3. Adsorpciona kinetika i mehanizam procesa adsorpcije

Kinetika adsorpcije boje KV na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu, takođe je analizirana korišćenjem modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog modela međučestične difuzije. Kinetički parametri adsorpcije boje izračunati su iz vrednosti nagiba i odsečaka linearizovanih oblika kinetičkih modela i rezultati su prikazani u **tabeli 6.7**.

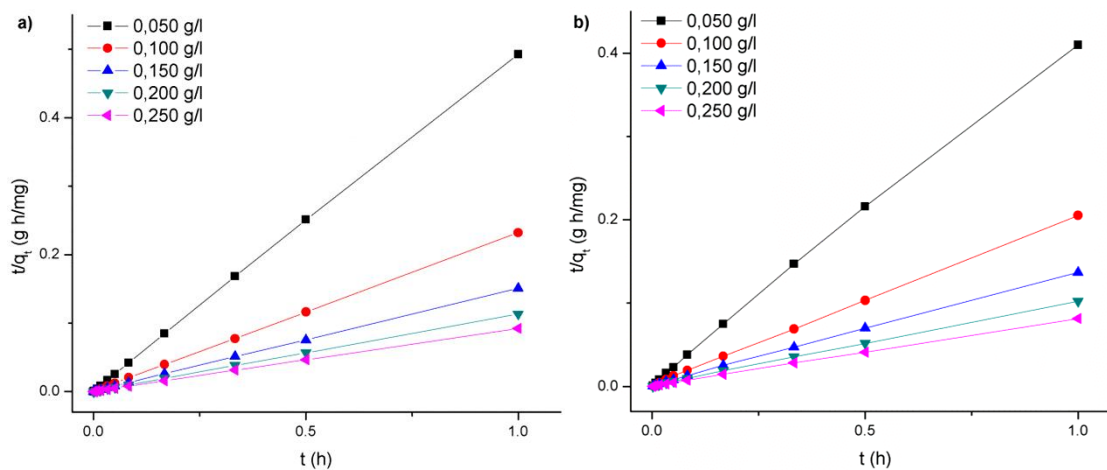
Analiziranjem slaganja koeficijenata linearne regresije (R^2), čije su vrednosti bile bliske jedinici na celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija, i eksperimentalno dobijenih adsorpcionih kapaciteta sa predviđenim vrednostima kinetičkih modela ($q_{e,(eks/mod)}$), pronađeno je da bi se kinetika adsorpcije boje KV na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu mogla najbolje aproksimirati modelom pseudo-drugog reda. Uočena su neznatna odstupanja između dobijenih eksperimentalnih i teorijski predviđenih vrednosti za adsorpcione kapacitete, a rezultati su grafički predstavljeni na **slici 6.14**.

Tabela 6.7. Kinetički parametri adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu

K.B. (g/l)	$q_{e,eks}$ (mg/g)	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		k_1 (1/h)	$q_{e,mod}$ (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg·h)	$q_{e,mod}$ (mg/g)	R^2
Neaktivirani zeolit							
0,050	2,031	4,356	0,151	0,725	221,849	2,024	0,999
0,100	4,311	7,428	0,441	0,955	98,854	4,320	0,999
0,150	6,629	7,479	0,767	0,896	47,159	6,641	0,999
0,200	8,832	5,389	0,992	0,974	33,074	8,846	0,999
0,250	10,851	4,904	1,226	0,979	27,615	10,852	0,999
Aktivirani zeolit							
0,050	2,481	1,874	0,099	0,754	191,262	2,482	0,999
0,100	4,962	4,488	0,361	0,956	76,967	4,951	0,999
0,150	7,489	6,193	0,829	0,984	37,779	7,611	0,999
0,200	9,964	4,718	0,974	0,959	26,224	9,927	0,999
0,250	12,451	4,342	1,055	0,836	26,529	12,404	0,999

K.B.: Početna koncentracija boje kristal violet u reakcionoj smeši;

* : q_e , eksperimentalno;
 ** : q_e , modelovano.

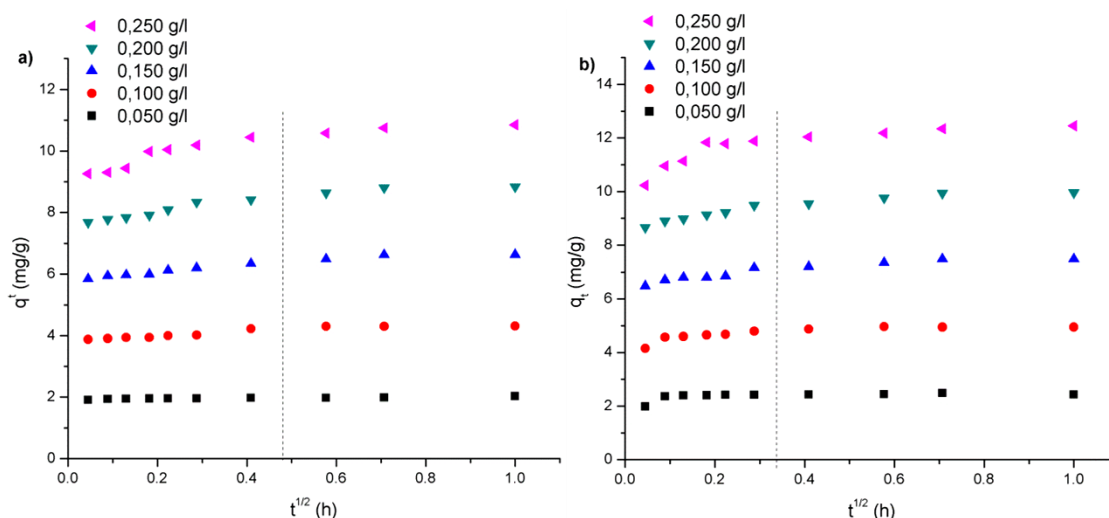


Slika 6.14. Kinetika adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom (a) i aktiviranom (b) zeolitu po modelu pseudo-drugog reda

Kao i kod primene neaktiviranih/aktiviranih repinih rezanaca za adsorpciju boje KV, za celokupni ispitani vremenski period, adsorpcioni sistem se pokorava kinetičkom modelu pseudo-drugog reda. Dakle, adsorpcija se dešava usled hemisorpcije i ona predstavlja kotrolišući korak brzine adsorpcije. Stopa uklanjanja boje je u funkciji stope okupiranja adsorpcionih mesta i proporcionalna je broju slobodnih mesta, što se slaže sa kinetikom adsorpcije katjonskih boja na zeolitu koju su izneli drugi autori [179].

Upoređivanjem sa ranijim literaturnim podacima, kinetika adsorpcija različitih boja, malahit zelene, reaktivne crvene 239 (RR-239), reaktivne plave 250 (RB-250) i toluidne plave na zeolitu, zasniva se, takođe, po modelu pseudo-drugog reda [180-182]. Različita modifikacija površine zeolita ili pak sinteza adsorbenata na bazi zeolita, može dovesti do toga da kinetika adsorpcije sledi model pseudo-prvog reda. Ovakve rezultate su postigli Panić i Veličković, gde je kinetika adsorpcija katjonske boje, bazno žute 28, na sintetisanom adsorbentu na bazi zeolita tipa A i tipa ZSM-5, pratila model pseudo-prvog reda [183].

Mehanizam procesa adsorpcije KV boje na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu analiziran je dalje ispitivanjem slaganja eksperimentalnih rezultata sa modelom međučestične difuzije. Grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ prikazan je na **slici 6.15**.



Slika 6.15. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom (a) i aktiviranom (b) zeolitu

Grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ je linearan, ne prolazi kroz koordinatni početak i samim tim međučestična difuzija nije jedini kontrolišući korak u procesu [2]. Proces adsorpcije KV boje na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu je multiliniarni proces i odigrava se u dve faze, za razliku od primene adsorbenata od repinih reznaca u kome se razlikuju tri faze. Tokom prve faze dolazi do spontane adsorpcije kao posledice elektrostatičkih interakcija između molekula boje i površine neaktiviranog/aktiviranog zeolita. U drugoj ravnotežnoj fazi dolazi do usporavanja međučestične difuzije zbog niske koncentracije boje u rastvoru. Do sličnih rezultata sa ovim difuzionim modelom došli su i drugi istraživači koji su proučavali adsorpciju boja na zeolitu [180, 183, 184]. Alver i Metin (*Alver i Metin*) (2012) su pronašli da se proces adsorpcije anjonskih boja na zeolitu odvija u tri faze [182].

Konstante međučestične difuzije i efekti graničnog sloja pri različitim koncentracijama KV boje prikazani su u **tabeli 6.8**.

Tabela 6.8. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije kristal violet na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu

K.B. (g/l)	k_{ID1} mg/g·h ^{1/2}	C₁	R₁²	k_{ID2} mg/g·h ^{1/2}	C₂	R₂²
<i>Neaktiviran zeolit</i>						
0,050	0,142	1,921	0,757	0,029	4,282	0,951
0,100	0,894	3,811	0,901	0,271	6,377	0,103
0,150	1,360	5,793	0,973	0,404	8,451	0,350
0,200	2,225	7,570	0,937	0,595	10,273	0,752
0,250	3,589	9,107	0,891	0,129	1,901	0,986
<i>Aktiviran zeolit</i>						
0,050	1,342	2,116	0,379	0,131	2,372	0,846
0,100	2,083	4,241	0,658	0,136	4,848	0,391
0,150	2,315	6,429	0,852	0,473	7,065	0,626
0,200	3,145	8,562	0,972	0,686	9,341	0,696
0,250	6,722	10,234	0,804	0,699	11,785	0,897

K.B.: Početna koncentracija boje kristal violet u reakcionoj smeši (g/l).

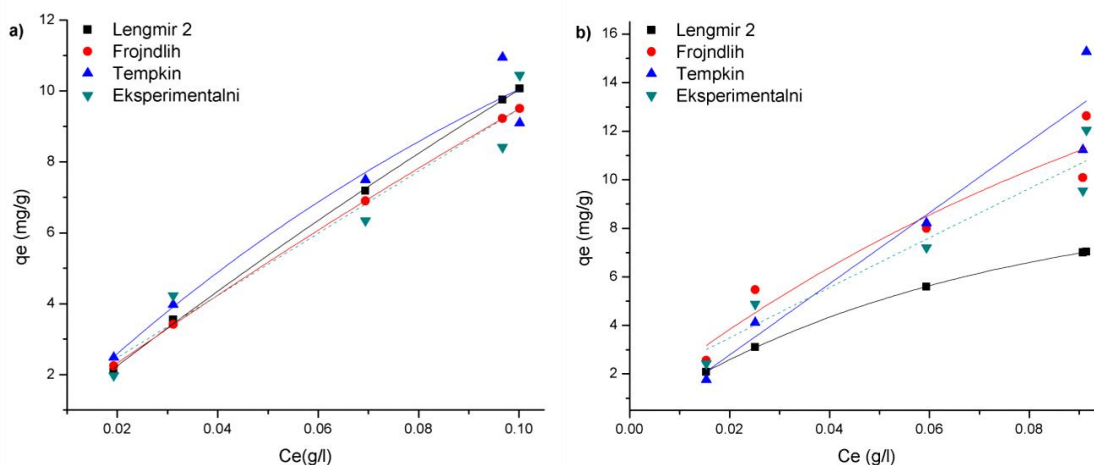
Sa porastom početne koncentracije boje u rastvoru, rastu i pozitivne vrednosti mehaničkih konstanti, čime se objašnjava da se adsorpcija boje na

neaktiviranom/aktiviranom zeolitu odigrala u relativno kratkom vremenskom periodu [165].

6.2.4. Adsorpcione izoterme

Ravnotežni uslovi adsorpcije boje KV na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu, analizirani su korišćenjem istih modela izotermi kao i kod primene adsorbenata od repinih rezanaca. Grafički su prikazane na **slici 6.16.**, a vrednosti odgovarajućih konstanti u **tabeli 6.9.**

Posmatrajući grafičke prikaze adsorpcionih izotermi (**slika 6.16.**) procesa adsorpcije boje KV na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu, može se uočiti da je priroda ovih procesa bila slična. Imajući u vidu koeficijente korelacije, R^2 , Lengmirova i Frojndlihovala izoterma su pokazale najviše vrednosti, dok se eksperimentalni rezultati ipak najbolje slažu sa Frojndlihovim modelom kod primene oba adsorbenta od zeolita. Tempinova izoterma, kod primene aktiviranog zeolita, je konkavnog oblika što ukazuje na nekompatibilnost modela sa aktuelnim sistemom.



Slika 6.16. Adsorpcione izoterme procesa adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom (a) i aktiviranom (b) zeolitu (25 °C)

Tabela 6.9. Ravnotežni parametri adsorpcionih izoterma boje KV na neaktiviranom i aktiviranom zeolitu

Lengmir			Frojdlih			Tempkin		
R_L^2	K_L (l/mg)	q_m (mg/g)	R_F^2	n	K_F (mg/g)(l/g) ⁿ	R_T^2	k_{1T} (J/mol)	k_{2T} (ml/mg)
Neaktivirani zeolit								
0,936	0,010	106,270	0,934	1,141	1,263	0,896	4,384	0,370
Aktivirani zeolit								
0,973	0,119	13,477	0,977	1,278	1,776	0,869	4,759	0,946

Zasićenost monosloja aktiviranog zeolita je 13,477 mg/g, a vrednosti faktora razdvajanja, R_L , su između 0 i 1, što ukazuje da je proces adsorpcije povoljan i da se spontano odigrava [163]. Stepem povoljnosti je uglavnom povezan sa ireverzibilnošću sistema, dajući kvalitetnu procenu interakcije adsorbent-adsorbat. Što su bliži nuli, to je proces nepovratan [185]. Frojndlihova jednačina se koristi da opiše heterogene sisteme i reverzibilnu adsorpciju i nije ograničena na formiranje monoslojeva [179]. Veći K_F ukazuje i na veći adsorpcioni kapacitet, što je i potvrđeno dobijenim većim adsorpcionim kapacitetom za aktivirani zeolit [186]. Takođe, i vrednosti n su bile veće od jedinice što ukazuje na povoljnu adsorpciju KV boje i u skladu je sa dobijenim vrednostima faktora razdvajanja.

U literaturi je prethodno zabeleženo da je adsorpcija katjonskih boja na prirodnom zeolitu najčešće u skladu sa Frojndlihovom adsorpcionom izotermom [187, 188] ili i sa Frojndlihovim i Lengmirovim adsorpcionim izotermama [179, 180].

6.2.5. Optimizacija procesa adsorpcije korišćenjem metodologije odzivne površine

6.2.5.1. Postavljanje modela eksperimenta

Za optimizaciju procesa adsorpcije boje KV na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu i statističku obradu podataka takođe je korišćen softver Design Expert 8. Primenom metodologije odzivne površine (RSM) procenjen je uticaj procesnih parametara na efikasnost uklanjanja boje KV iz vodenog rastvora. U matrici CCD za neaktivirani/aktivirani zeolit, posmatrana su dva odziva: procenat uklanjanja boje (Y_1 , %) i adsorpcioni kapacitet (Y_2 , mg/g). U **tabeli P-2.2.** u prilogu 2 prikazane su njihove eksperimentalne vrednosti.

Vrednosti adsorpcionog kapaciteta i procenta uklanjanja boje KV za neaktivirani zeolit, kretale su se redom od 0,431 mg/g do 11,841 mg/g i od 20,545 % do 93,723 %. Što se tiče adsorpcije aktiviranim zeolitom, vrednosti ovih izlaznih parametara modela kretale su se redom od 0,431 mg/g do 34,085 mg/g i od 40,641 % do 99,619 %. Upoređivanjem adsorpcionih kapaciteta ove dve vrste adsorbenata od prirodnog zeolita, može se uočiti da je mikrotalasna aktivacija pozitivno delovala na aktivaciju adsorbenta i poboljšala adsorpcione karakteristike aktiviranog zeolita. Došlo je do povećanja oba parametra. Adsorpcioni kapacitet se povećao oko 3 puta, a procenat uklanjanja boje za oko 5 %. U poređenju adsorpcijom boje KV adsorbentima od otpadnih repinih rezanaca, pokazalo se da aktivirani zeolit ima sposobnost da adsorbuje veću količinu boje po jedinici svoje mase, dok je maksimalni adsorpcioni kapacitet neaktiviranog zeolita bio najniži od svih testiranih adsorbenata.

6.2.5.2. Ocena značajnosti modela i ulaznih procesnih parametara

Analiza varijanse (ANOVA) eksperimentalno dobijenih rezultata dala je ocenu značajnosti odziva i procesnih promenljivih kvadratnih modela procesa adsorpcije KV boje na neaktiviranom i aktiviranom zeolitu. Statističke analize modela su predstavljene u **tabelama 6.10. i 6.11.**

Tabela 6.10. Analiza varijanse odziva eksperimentalnih dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu

Izvor	R ²	F vrednost	P- vrednost prob>F	K.V.	A.P.
Y _{1N}	0,976	88,374	<0,0001 ^z	12,859	24,278
Leak of fit *		1,798	0,5428 ⁿ		
Y _{2N}	0,992	264,609	<0,0001 ^z	4,365	50,816
Leak of fit		4,977	0,1057 ⁿ		
Y _{1A}	0,982	119,891	<0,0001 ^z	12,583	35,941
Leak of fit		3,422	0,1699 ⁿ		
Y _{2A}	0,961	55,234	<0,0001 ^z	5,124	27,224
Leak of fit		1,261	0,4863 ⁿ		

Y_{1N}/Y_{1A}: Adsorpcioni kapacitet neaktiviranog/aktiviranog zeolita;

Y_{2N}/Y_{2A}: Procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim zeolitom;

K.V.: Koeficijent varijacije (%);

A.P.: Adekvatna preciznost;

*: Nedostatak fitovanja (*Leak of fit*);

^z: Značajan;

ⁿ: Nije značajan.

Svi regresioni modeli su ocenjeni kao značajani (Prob>F=<0,001) i odzivi se mogu dobro opisati predviđenim jednačinama, jer vrednosti nedostatka fitovanja modela nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Dakle, kontrolne eksperimentalne vrednosti su pravilno raspoređene oko odgovarajuće srednje rednosti (**tabela 6.10.**).

Za potrebe regresione analize, posmatrani model se modifikuje i redukuje odbacivanjem faktora koji nisu značajni (Prob>F=>0,05, **tabela 6.11.**) i dobijene polinomalne jednačine drugog reda najbolje opisuju dati odziv procesa adsorpcije boje. Pozitivni predznak regresionih koeficijenata odnosi se na sinergistički efekat na odziv, dok se negativni predznak odnosi na njihov antagonistički efekat.

Tabela 6.11. Analiza varijanse procesnih parametara eksperimentalnih dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu

Faktori	prob>F			
	Y _{1N}	Y _{2N}	Y _{1A}	Y _{2A}
A	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z
B	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0148 ^z
C	<0,9676	<0,0008 ^z	<0,0023 ^z	<0,0001 ^z
AB	<0,0001 ^z	<0,0001	<0,0050 ^z	<0,4734
AC	<0,0001 ^z	<0,1089	<0,0008 ^z	<0,0001 ^z
BC	<0,0801	<0,3760	<0,4166	<0,6345
A ²	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,0010 ^z
B ²	<0,0001 ^z	<0,0001 ^z	<0,4357	<0,9801
C ²	<0,1945	<0,0334 ^z	<0,6719	<0,0109 ^z

Y_{1N}/Y_{1A}: Adsorpcioni kapacitet neaktiviranog/aktiviranog zeolita;

Y_{2N}/Y_{2A}: Procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim zeolitom;

^z: Značajan.

Višestruka regresiona analiza eksperimentalnih podataka dala je sledeće polinomalne jednačine drugog reda:

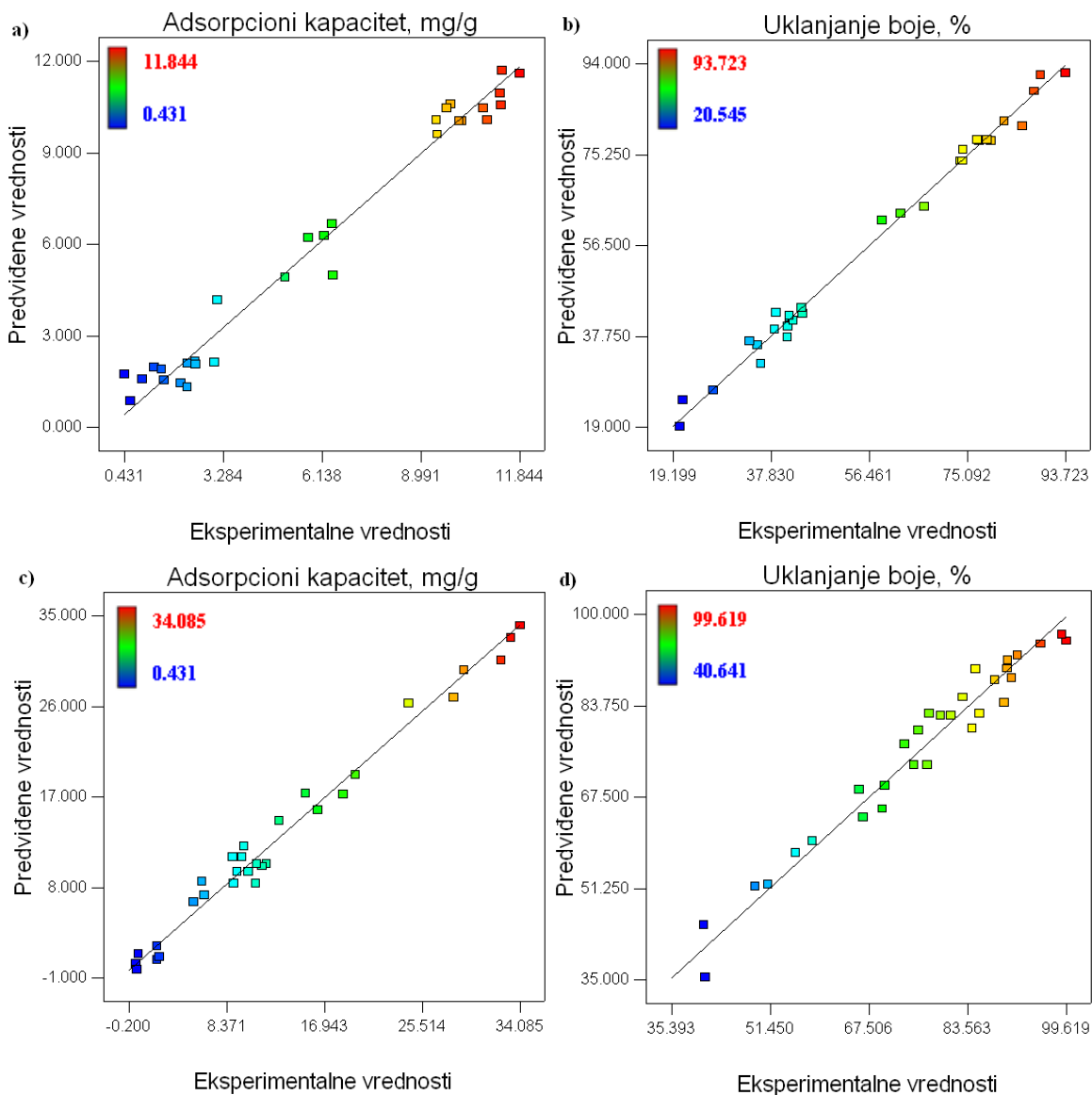
$$Y_{1N} = 10,46 + 1,66 \times A + 3,08 \times B + 1,70 \times AB - 3,07 \times A^2 - 2,16 \times B^2 \quad (6.5)$$

$$Y_{2N} = 78,37 + 13,95 \times A - 13,67 \times B + 2,20 \times C + 11,16 \times AB - 16,77 \times A^2 - 8,12 \times B^2 - 2,23 \times C^2 \quad (6.6)$$

$$Y_{1A} = 9,44 - 8,08 \times A + 5,94 \times B - 1,29 \times C - 1,50 \times AB + 1,63AC + 4,65 \times A^2 \quad (6.7)$$

$$Y_{2A} = 81,83 + 16,27 \times A - 2,12 \times B - 4,41 \times C + 4,71AC - 4,04 \times A^2 - 4,28 \times C^2 \quad (6.8)$$

pri čemu su Y_{1N}/Y_{1A} predviđeni odzivi za adsorpcioni kapacitet neaktiviranog/aktiviranog zeolita, Y_{2N}/Y_{2A} predviđeni odzivi za procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim zeolitom, a A, B, C i D su procesne promenljive (**tabela 5.2.**).



Slika 6.17. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva eksperimentalnog dizajna: adsorpcioni kapacitet neaktiviranog (a) i aktiviranog (b) zeolita, procenat uklanjanja boje neaktiviranim (c) i aktiviranim (d) zeolitom

U svim slučajevima, vrednosti koeficijenta korelacije R^2 bile su bliske jedinici, što ukazuje na dobru korelaciju između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti odziva, kao i da se većina podataka uklapa u zadati regresioni model. Najviša vrednost R^2 bila je za procenat uklanjanja boje neaktiviranim zeolitom, a najniža za procenat uklanjanja boje aktiviranim zeolitom. Dakle, kod ovog odziva (Y_{2A}) postoji najlošija korelacija

između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti, što se poklopilo i kad su primenjivani aktivirani repini rezanci za uklanjanje boje KV (**Slika 6.17.(a-d)**). Istovremeno, relativno niske vrednosti koeficijenta varijacije (K.V., %), ukazuju na bolju preciznost i pouzdanost izvršenih eksperimenata (**tabela 6.11.**). Urađena validacija modela pokazala je bliske vrednosti predviđenih i validiranih rezultata. Odabrane su nasumično po dve tačke iz numeričke optimizacije neaktiviranog/aktiviranogzeolita, čije su vrednosti očitane direktno iz softverskog paketa. Dobijeni rezultati su potvrdili pogodnost primene prethodno predloženog dizajna (**Tabela 6.12.**).

Tabela 6.12. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna adsorpcije boje kristal violet na neaktiviranom/aktiviranom zeolitu

Faktori			Odzivi			
A	B	C	Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano
g/l	g/l	s	Y_1 (mg/g)		Y_2 (%)	
<i>Neaktivirani zeolit</i>						
11,1	0,216	746	10,883	11,124	79,672	79,176
18,1	0,250	891	11,972	12,435	93,725	94,436
<i>Aktivirani zeolit</i>						
6,8	0,250	120	28,071	28,137	68,670	68,631
20	0,250	642	10,095	11,063	92,796	93,364

A: Količina adsorbenta;

B: Početna koncentracija boje;

C: Vreme trajanja procesa;

Y_1 : Adsorpcioni kapacitet;

Y_2 : Procenat uklanjanja boje.

6.2.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet

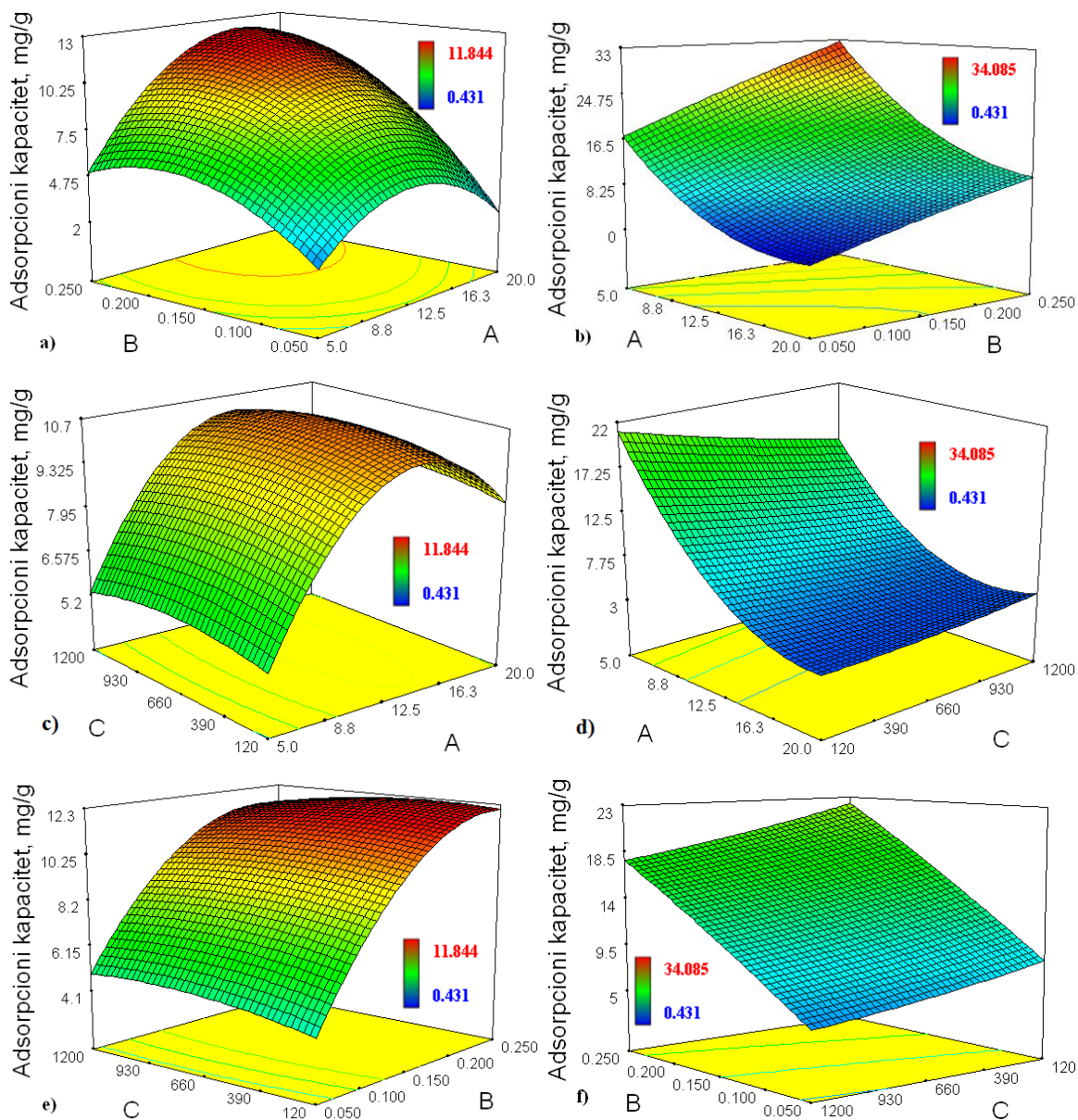
Za adsorpcioni kapacitet neaktiviranog zeolita, na osnovu ANOVA statistike, svi pojedinačni i interaktivni efekti procesnih parametara A i B su statistički značajno uticali na ponašanje odziva u posmatranom sistemu (**tabela 6.11.**). Što se tiče primene aktiviranog zeolita, svi pojedinačni efekti procesnih parametara su bili značajni, kao i interaktivni efekti parametara A/B, A/C i A^2 . Uticaji nekih od značajnih interaktivnih efekata ispitivanih procesnih parametara, na promene adsorpcionog kapaciteta boje na

neaktiviranom/aktiviranom zeolitu, prikazani su i grafički na **slici 6.18.(a-f)**. Ostale vrednosti procesnih promenljivih, tom prilikom, su postavljene njihove srednje vrednosti. Kod primene neaktiviranog zeolita za uklanjanje boje KV iz vodenih rastvora, maksimalni adsorpcioni kapacitet je postignut pri: količini adsorbenta od 20 g/l, početnoj koncentraciji boje od 0,250 g/l i vremenu trajanja procesa od 120 s (11,844 mg/g). Maksimalni adsorpcioni kapacitet boje na aktiviranom zeolitu, postiže se pri količini adsorbenta od 1,9 g/l, početnoj koncentraciji boje od 0,150 g/l i vremenu trajanja procesa od 120 s (34,085 mg/g).

Posmatrajući grafike interaktivnih odnosa količinom adsorbenata sa koncentracijom boje i vremenom trajanja procesa, može se uočiti da sa smanjenjem početne količine aktiviranog zeolita raste adsorpcioni kapacitet boje KV adsorbenta. Smanjenje kapaciteta adsorbenta sa porastom njegove količine je posledica raskola u koncentracionom gradijentu između koncentracije boje u rastvoru i na površini adsorbenta [37, 189]. Takođe, pri većim količinama adsorbenta može doći do preklapanja ili agregacije adsorbenta čime se smanjuje ukupna adsorpciona površina [169, 170]. Pozitivan uticaj ove procesne promenljive na adsorpcioni kapacitet su primetili i ranije Kiu (*Qiu*) i saradnici (2009) tokom adsorpcije boje na zeolitu [190, 191]. Međutim, kod primene neaktiviranog zeolita, primećen je negativan uticaj faktora A. Dakle, sa porastom količine adsorbenta do srednje vrednosti raste i adsorpcioni kapacitet adsorbenta. U opsegu količine adsorbenta od 1,250 do 2 mg/g i viših koncentracija boje postižu se i najviši adsorpcioni kapaciteti. Uzrok ovakvog ponašanja je verovatno taj da je neaktivirani zeolit manje porozan i da je potrebna dovoljna količina adsorbenta da bi adsorpcija bila uspešna. Uz to je i brzina mešanja uzoraka očigledno bila dobra, tako da nije došlo do agregacije adsorbenta iako je njegova masa bila povećana.

Početna koncentracija boje na adsorpcioni kapacitet neaktiviranog/aktiviranog zeolita ima pozitivan uticaj. Sa porastom početne koncentracije KV boje raste i adsorpcioni kapacitet boje na adsorbentima. Sa porastom koncentracije boje raste i pokretačka snaga molekula boje kojom savlađuju otpor prenosa mase između dve faze (tečne i čvrste). Ujedno se i pojačava interakcija između adsorbata i adsorbenta [37]. Isti efekti ovog

procesnog parametara na proces adsorpcije boja na zeolitu, zapaženisu i u literaturi [192-194].

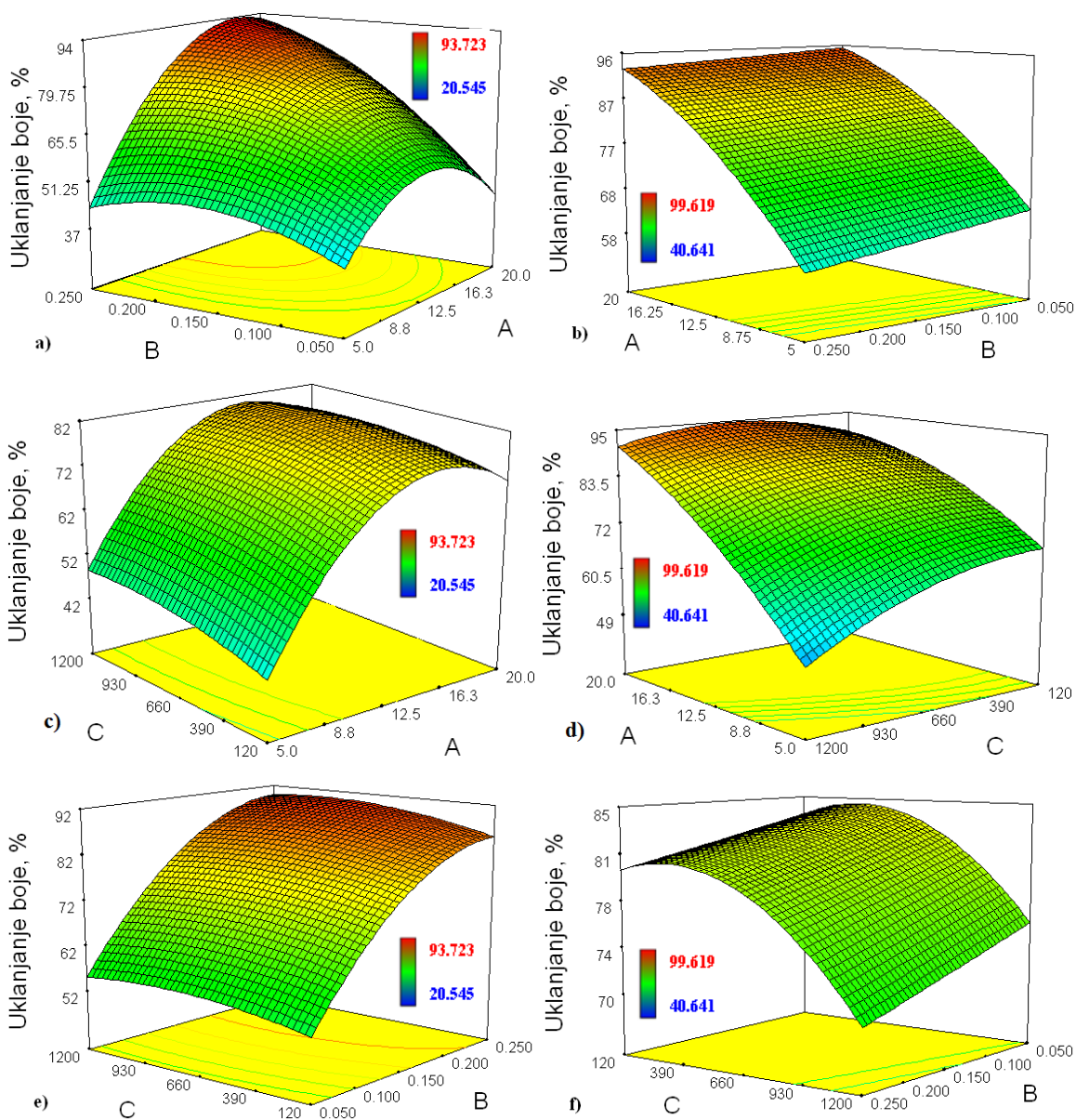


Slika 6.18. 3D grafik interaktivnih efekata količine adsorbenta i: koncentracije boje (a-b), i vremena mešanja (c-d); i koncentracija boje i vremena mešanja (e-f) na adsorpcioni kapacitet neaktiviranog/aktiviranog zeolita

Uticao vremena trajanja procesa na adsorpcioni kapacitet neaktiviranog i aktiviranog zeolita je bio skoro isti, s tim što je uticaj ovog faktora neznatno negativniji kod primene aktiviranog zeolita. Verovatno je ovakav efekat posledica desorpcije tokom vremena. Ravnoteža adsorpcije boje KV se postiže relativno brzo kod primene ovih adsorbentata, od 5 do 10 minuta, pa samim tim, nakon ovog vremenskog perioda, i sa porastom vrednosti ostala dva procesna parametra, postignute su najviše vrednosti adsorpcionih kapaciteta. Pri istom trajanju kontakta između dve faze (120 s), postignuti su maksimalni adsorpcioni kapaciteti, s tim što je adsorpcioni kapacitet aktiviranog zeolita bio tri puta veći. Adsorpcioni kapaciteti za katjonske boje, metilensko plavo i Oranž II na modifikovanom zeolitu bili su niži i iznosili su redom oko 12 mg/g i 3 mg/g. Potrebno vreme da se ostvare navedeni kapaciteti su 30 minuta kod adsorpcije metilenskog plavog i 40 minuta kod uklanjanja Oranž II boje [195]. Zatim zabeleženo je da je adsorpcioni kapacitet prirodnog zeolita za malahit zelenu boju oko 15 mg/g i postiže se nakon 160 minuta [181].

6.2.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjene boje iz rastvora

ANOVA statistika je pokazala da su za odziv procenta uklanjanja boje neaktiviranim zeolitom značajni svi efekti pojedinačnih faktora, kao i interaktivni efekti A/B, A², B², C². Kod primene aktiviranog zeolita, razlika je u statističkoj značajnosti interaktivnih efekata, gde su bili značajni AC, A², C². Uticaji interaktivnih efekata količine adsorbenta sa početnom koncentracijom boje i vremenom trajanja procesa, na promene procenta uklanjanja boje KV primenom neaktiviranog/aktiviranog zeolita, prikazani su i grafički na **slici 6.19.(a-f)**. Ostale vrednosti procesnih promenljivih, tom prilikom, su postavljene na njihove srednje vrednosti. Kod primene neaktiviranog zeolita, maksimalni procenat uklanjanja boje KV je postignut pri: količini adsorbenta od 20 g/l, početne koncentracije boje od 0,250 g/l i vremena trajanja procesa od 600 s. Maksimalan procenat uklanjanja boje na aktiviranim zeolitom je postignut pri različitom početnom koncentracijom boje od 0,050 g/l, dok su ostala dva parametra bila jednaka.



Slika 6.19. 3D grafik interaktivnih efekata količine adsorbenta i: koncentracije boje (a-b), pH rastvora (c-d) i vremena mešanja (e-f) na procenat uklanjanja KV boje neaktiviranim/aktiviranim zeolitom

Na osnovu grafika zavisnosti količine adsorbenta (A) i koncentracije rastvora (B) boje KV (**slika 6.19.(a-b)**) i kod primene neaktiviranog i aktiviranog zeolita, količina adsorbenta ima pozitivni uticaj na obezbojavanje rastvora boje. Sa porastom količine adsorbenta raste i procenat obezbojavanja rastvora, stim što je efekat uticaja količine

aktiviranog zeolita na efikasnost uklanjanja boje jači. Na to ukazuje i oštriji pad krive parametra A (**slika 6.19.b**) u odnosu na krivu parametra A kod neaktiviranog zeolita (**slika 6.19.a**). Sa povećanjem količine adsorbenta raste i adsorpciona površina kao i broj aktivnih mesta za koje će se vezati boja [191]. Ovakvo ponašanje je zabeleženo i ranije u literaturi adsorpcije katjonskih i anjonskih bojana zeolitu [182, 190].

Efekat početne koncentracije boje na procenat uklanjanja adsorbata imao je suprotan efekat kod primene neaktiviranog zeolita u odnosu na aktivirani zeolit. Efekat početne koncentracije boje, u procesu adsorpcije boje neaktiviranim zeolitom, je pozitivan. Dakle, sa porastom koncentracije boje raste i ovaj odziv. Nasuprot ovome, uticaj faktora B je negativan, što znači da sa smanjenjem koncentracije boje raste neznatno procenat uklanjanja boje aktiviranim zeolitom. Za konstantnu dozu adsorbenta, pri višim koncentracijama boje, dostupna adsorpciona mesta su sve manja pa stoga dolazi do smanjenja procenta obezbojavanja (**slika 6.19.(e-f)**). Ovakav negativan efekat početne koncentracije boje na procenat uklanjanja katjonskih boja klinoptilolitom, primetili su i Kiu (*Qiu*) i saradnici (2009) [190].

Vreme trajanja procesa adsorpcije, takođe ima antagonistički efekat kod primene neaktiviranog i aktiviranog zeolita. Uticaj ovog faktora kod primene neaktiviranog zeolita je neznatno pozitivan, a kod aktiviranog zeolita neznatno negativan. Ovakav negativan efekat je verovatno posledica desorpcije tokom trajanja procesa. U oba slučaja je maksimalni procenat uklanjanja boje postignut za upola kraće vreme nego što je maksimalno zadato modelom. U vezi s tim se na graficima, gde je jedan od parametara parametar C, javlja takozvano sedlo na sredini opsega parametra (**slika 6.19.(c-f)**).

6.3. BIORAZGRADNJA KATJONSKE BOJE VRSTAMA RODA *STREPTOMYCES*

Nakon uspešne adsorpcije boje KV na adsorbentima od otpadnih repinih reznaca, u vodenom rastvoru boje uvek zaostaje određena količina. Nakon zasićenja adsorbenta bojom, on nije više u stanju da veže preostalu količinu boje u vodenom rastvoru. Preostala boja bi se mogla dalje ukloniti procesom biorazgradnje. U vezi sa tim, pristupilo se ispitivanju biorazgradne moći boje KV novim sojevima roda *Streptomyces* po proceduri opisanoj u odeljku 5.5.1. Definisani su i analizirani uslovi njihove maksimalne biorazgradnje boje, a ispitana je i fitotoksičnost nastalih biorazgradnih proizvoda po proceduri opisanoj u odeljku 5.5.2. Urađeni su i enzimski profil korišćenih sojeva i kvantifikovane vrednosti odgovarajućih enzimskih aktivnosti sa ciljem definisanja potencijalnih mehanizama procesa biorazgradnje.

Ispitana je, takođe, i mogućnost biorazgradnje adsorbovane boje na aktivirane repine rezance po proceduri opisanoj u odeljku 5.5.3. iz dva aspekta. Prvi je taj da se regeneriše korišćeni adsorbent jer kao takav sa adsorbovanom bojom predstavlja veliki problem odlaganja na deponije. A drugi aspekt je taj da se napravi jedan integrisan sistem u postupcima prečišćavanju obojenih otpadnih voda procesima adsorpcije i biorazgradnje.

6.3.1. Biorazgradnja boje kristal violet sojem *Streptomyces fulvissimus* CKS7

6.3.1.1. Enzimski profil soja

Na osnovu analiza morfoloških karakteristika i homolognih sekvenci u NCBI Blast, radni mikroorganizam CKS7 je identifikovan kao *Streptomyces fulvissimus* vrsta. Komparativna analiza genomskih sekvenci 16S DNK pokazala je 99 % poklapanje sekvenci, a 16S rRNK kodirajuća sekvenca soja je deponovana pod kataloškim brojem KP715854.1 u NCBI GenBank. Izgled nativnog i fiksiranog preparata soja CKS7 prikazani su na slici u prilogu 3 (slika P-3.1.(a-b)).

Karakterizacija ekstracelularnih enzima soja CKS7 je izvršena korišćenjem sledećih kvalitativnih testova: test za peroksidaze, lignin-peroksidazu, mangan-peroksidaze, lakazu i
























API-ZIM test. Rezultati kvalitativnih testova za lignolitičke enzime prikazani su u **tabeli 6.13.**, dok su rezultati API-ZIM testa prikazani u **tabeli 6.14.**

Table 6.13. Enzimski profil lignolitičkih enzima *Streptomyces fulvissimus* CKS7

Enzim	Supstrat	Prisustvo
peroksidaze	pirogalol	+
lignin-peroksidaza	metilensko plava	+
mangan nezavisna/zavisna peroksidaza	fenol crvena	-/+
lakaza	ABTS/ α -naptol/ gvajakol	-/-/-

Kvalitativni testovi su pokazali da soj CKS7 poseduje lignin-peroksidazu koja je od velikog značaja za razgradnju trifenilmetanskih boja, kojima pripada i boja KV. Smatra se da ovaj enzim igra glavnu ulogu u procesu biorazgradnje. Za ekstracelularne peroksidaze je pokazano da su sposobne da katalizuju širok spektar strukturno različitih organskih jedinjenja, uključujući i polimerne boje iz tekstilne industrije, koje su među najteže razgradivim [8, 196]. Konkretno, lignin-peroksidaza je sposobna da katalizuje benzil oksidaciju, cepanje C-C veza, hidroksilaciju, fenol dimerizaciju i 0-demetilaciju [197]. Takođe, za svoju aktivnost ovaj enzim ne zahteva i prisustvo mangan-peroksidaze, koje bi mogle da imaju ulogu da započnu razgradnju ovih boja [198, 199].

Table 6.14. API-ZIM profil enzima *Streptomyces fulvissimus* CKS7

Fosfataze			Esteraze			Amino peptidaze			Proteaze			Glikozil hidrolaze						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
																		
1: alkalna fosfataza; 2: kisela fosfataza; 3: naftol-AS-BI- fosfohidrolaza; 4: C4 esteraza; 5: C8 esteraza lipaza; 6: C14 lipaza; 7: leucin arilamidaza; 8: valin arilamidaza; 9: cistin arilamidaza; 10: tripsin; 11: α -chimotripsin; 12: α -galaktozidaza; 13: β -alaktoidaza; 14: β -glukuronidaza; 15: α -glukozidaza; 16: β -glukozidaza; 17: N-acetil- β -glukosaminidaza; 18: α -manozidaza; 19: α -fukozidaza.																		
Intenzitet:				Jak (4-5)				Srednji (2-3)				Mali (1)				Nije detektovan		

API-ZIM test daje mogućnost da se odredi prisustvo enzima iz grupa: fosfataza, esteraza, amino peptidaza, proteaza i glikozil hidrolaza. Od devetnaest testiranih enzima, CKS7 poseduje petnaest (**tabela 6.14.**) i može se smatrati da ovaj soj ima jako bogat enzimski profil.

6.3.1.2. Uticaj procesnih parametara na biorazgradnju boje kristal violet

Uticipi procesnih promenljivih, brzina mešanja, veličina inokuluma, temperatura, vreme trajanja procesa i početna koncentracija boje, su ispitani na biorazgradnju boje KV uz pomoć bakterijske kulture CKS7 (**tabela 6.15.**). Rezultati biorazgradnje su izraženi preko procenta obezbojavanja vodenog rastvora boje KV. Ove procesne promenljive su odabrane na osnovu pregleda literaturnih podataka vezanih za prečišćavanje otpadnih voda uz pomoć mikroorganizama.

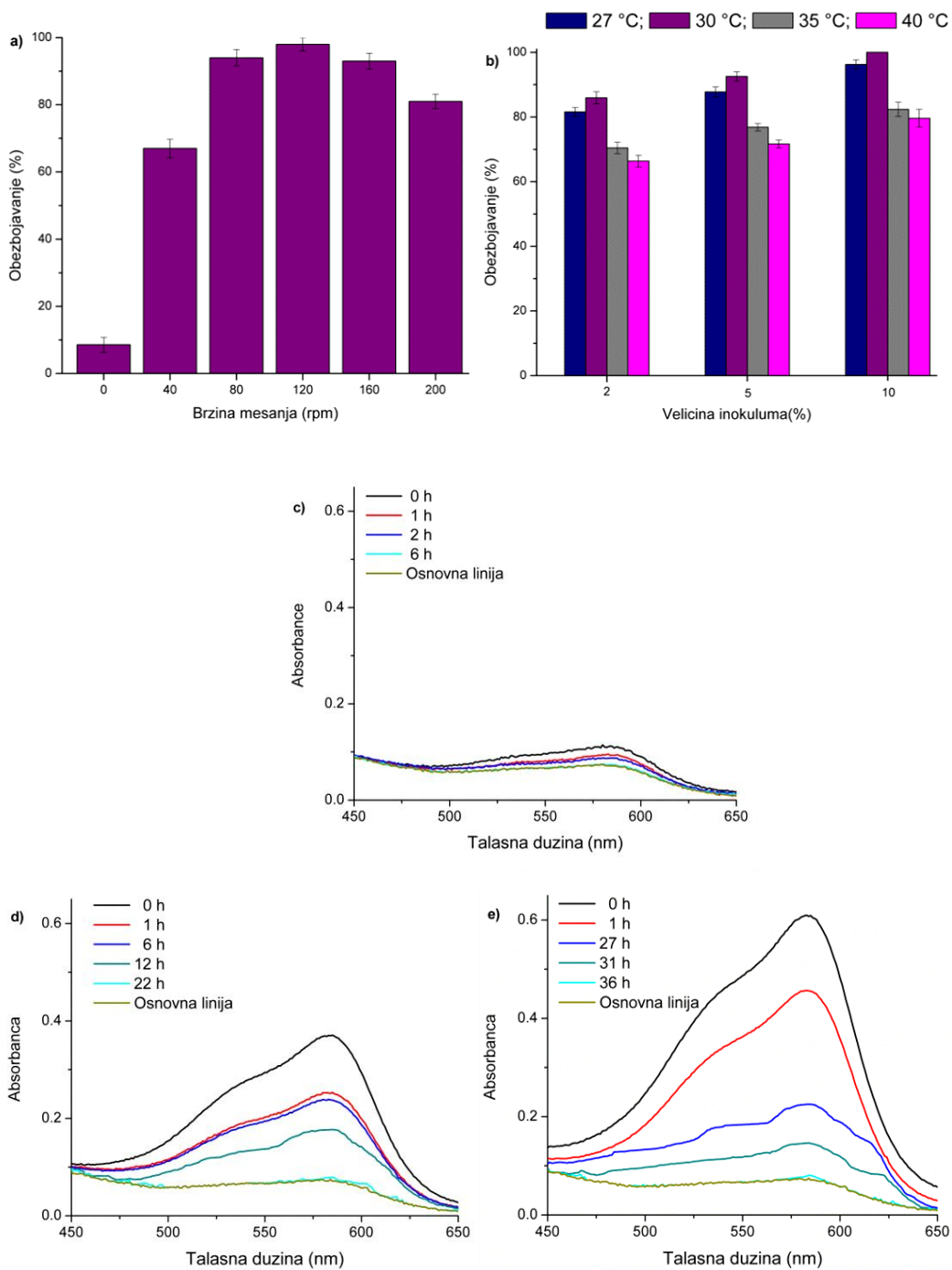
Table 6.15. Procesne promenljive i njihove vrednosti u eksperimentu obezbojavanja rastvora boje kristal violet pomoću *Streptomyces fulvissimus* CKS7

Faktori	Primenjene vrednosti									
Brzina mešanja (rpm)	0	40	80	120 [*]	160	200				
Temperatura (°C)	27	30 [*]	35	40						
Veličina inokuluma (%)	2	5	10 [*]							
Vreme trajanja procesa (h)	1	2	4	6	12	22	24 [*]	27	31	36
Koncentracija boje KV (g/l)	0,001 ^{*#}	0,003 [#]	0,005 [#]							

^{*}:konstantna vrednost procesne promenljive pri ispitivanju uticaja drugih efekata;

[#]:vrednosti koncentracija boje tokom ispitivanja vremenskog toka obezbojavanja.

Rezultati istraživanja uticaja procesnih promenljivih na efikasnost obezbojavanja vodenog rastvora bakterijskom kulturom, predstavljenisu na **slici 6.20.(a-e)**.



Slika 6.20. Uticaj brzine mešanja (a), temperature i veličine inokuluma (b), vremena trajanja procesa i početne koncentracije boje od 0,001 g/l (c), 0,003 g/l (d) i 0,005 g/l (e) na obezbojavanje rastvora boje kristal violet sojem *Streptomyces fulvissimus* CKS7

Pri statičnim uslovima obezbojavanja rastvora boje KV, zapaženo je gotovo potpuno odsustvo rasta bakterijske kulture. Bakterijskoj kulturi CKS7, neophodan je kiseonik za normalan rast i pri statičkim uslovima aeracija je izostala. U vezi sa tim, ostvaren je i najmanji procenat obezbojavanja vodenog rastvora, svega 10 % (slika 6.20.a). Takođe, u odsustvu mešanja, smanjen je ravnomeran kontakt između bakterijskih ćelija i čestica boje KV. Dakle, statički uslovi nisu bili odgovarajući za obezbojavanje rastvora. Shodno tome i biorazgradnja je bila veoma spora. Sa porastom brzine mešanja, smeše radnih rastvora bivaju sve uniformnije i pri dovoljno jakoj brzini postiže se optimalni kontakt između ćelija bakterija i čestica boje KV. Maksimalan procenat obezbojavanja je postignut pri brzini mešanja od 120 rpm. Kada brzina mešanja pređe ovu najbolju vrednost, proces obezbojavanja biva ometan na drugačiji način. Dolazi do smanjenja procenta obezbojavanja zbog jakih, skoro turbulentnih i dinamičkih uslova, koji nisu pogodni za aktuelni sistem. U literaturi ranijih istraživanja takođe su postignuti manje ili više slični rezultati. Na primer, za uspešnu i maksimalnu biorazgradnju boje KV i drugih trifenilmetanskih boja, *Staphylococcus epidermidis* zahteva brzinu mešanja od 150 rpm [4].

Uticao je temperatura i veličine inokuluma na obezbojavanje rastvora boje, su zajednički predstavljeni na slici 6.20.b. Uočeno je da porast veličine inokuluma doprinosi i porastu procenta obezbojavanja. Takođe se može primetiti, da se efikasnost obezbojavanja povećava, otprilike proporcionalno, za sve testirane temperature kada veličina inokuluma raste sa oko 2 % do oko 10 %. Porast obezbojavanja se kreće u od oko 16 % do oko 18 %, pri čemu je pronađeno da je najjači uticaj veličine inokuluma bio pri temperaturi odvijanja procesa od 27 °C. Dakle, za sve ispitane temperature, maksimalan procenat obezbojavanja je ostvaren pri veličini inokuluma od 10 %. Slična zapažanja su primećena i primenom *Kocuria rosea* MTCC 1532 i *Sphingomonas paucimobilis* za obezbojavanje rastvora malahit zelene boje (trifenilmetanska boja) [199, 200]. Što se tiče uticaja temperature, potpuno obezbojavanje rastvora boje KV (100 %) je postignuto na temperaturi od 30 °C. Pored toga, svi dobijeni rezultati i pri temperaturi od 27 °C su takođe ohrabrujući. Oni su se kretali u opsegu od oko 80 % do 96 %, dok je efikasnost uklanjanja boje na 35 °C i 40 °C bila daleko manja (maksimalni procenti obezbojavanja su bili redom 82,356 % i 79,612 %). I ranije su istraživači primetili da je najpovoljnija temperatura za biorazgradnju boje KV i

drugih trifenilmetanskih boja 25-30 °C [200, 201]. U nekim slučajevima, najpovoljnije temperature su dostigle vrednosti i od 37 °C [112], 40 °C [202] i 50-60 °C [109] u zavisnosti od izbora korišćenih mikroorganizama. Dakle, najpovoljnije temperature za biorazgradnju boje KV bakterijskom kulturom CKS7 su u opsegu 27-30 °C. Smatra se da su niže temperature, ekološki i najprihvatljivije, imajući u vidu aspekt njihove primene u prečišćavanju otpadnih voda. Dostizanje odgovarajuće temperature i njeno održavanje na tom nivou je jedna od najskupljih stavki u celom procesu. Takođe, obrađena otpadna voda, u ovom slučaju, bi se mogla direktno, bez hlađenja, ispuštati u životnu sredinu.

Vremenski tok obezbojavanja i uticaj početne koncentracije na biorazgradnju boje predstavljeni su na **slici 6.20.(c-e)** preko absorpcionih spektara za boju KV. Bakterijska kultura CKS7 uspeła je da sve početne koncentracije boje KV, 0,001 g/l, 0,003 g/l i 0,005 g/l, obezboji redom za 6 h, 22 h i 36 h. Dakle, vremenski tok obezbojavanja zavisio je od početne koncentracije boje. Početni absorpcioni pik (0 h) se postepeno smanjivao bez pomeranja i pojave novih pikova za vreme trajanja biorazgradnje i nakon određenog vremena potpuno je nestao. Ukoliko uporedimo uspešnost biorazgradnje bakterijskom kulturom CKS7, na primer, sa *Staphylococcus epidermidi*, vreme biorazgradnje trifenilmetanskih boja smanjeno je za polovinu vremena [4]. Treba napomenuti, da pored toga što su korišćeni različiti mikroorganizmi, i početna koncentracija boje je bila nešto niža od 0,001 g/l.

6.3.1.3. Fitotoksičnost biorazgradnih proizvoda

Neobrađena otpadna voda, iz industrija korisnika boje, može da dospe na poljoprivredno zemljište i u direktnom kontaktu sa njim da utiče na njegovu plodnost, izazivajući ozbiljne opasnosti po životnu sredinu i zdravlje. U tom smislu, studija fitotoksičnosti boje KV, pre i nakon biorazgradnje, postaje obavezna. Rezultati procene osetljivost semena pšenice *Triticum aestivum* na prisustvo boju KV i njenih razgradnih proizvoda, predstavljenisu u **tabeli 6.16**.

Table 6.16. Studija fitotoksičnosti boje kristal violet i njenih razgradnih proizvoda pomoću semena *Triticum aestivum*

P	KAM	Boja KV/razgradni proizvodi		
		0,001 g/l	0,003 g/l	0,005 g/l
RIKS	100	90 ^a /100 ^b	85 ^a /100 ^b	75 ^a /95 ^b
I	3,17±0,18	2,23±0,54 ^a /3,38±0,28 ^b	1,73±0,61 ^a /3,11±0,13 ^b	1,22±0,43 ^a /3,22±0,37 ^b
K	1,18±0,33	0,89±0,43 ^a /1,22±0,36 ^b	0,69±0,45 ^a /1,25±0,62 ^b	0,51±0,71 ^a /1,30±0,42 ^b

P: Parametri;

RIKS: Relativni indeks klijanja semena (%);

I: Dužina izdanka (cm);

K: Dužina korenčića (cm);

KAM: Kontrolni agar medijum;

^a: pre biorazgranje;

^b: nakon biorazgradnje.

Stopa klijanja semena predstavlja odgovarajući indikator hemijske toksičnosti. Studija fitotoksičnosti, uzoraka polaznih koncentracija boje KV, je pokazala smanjenje stope klijanja semena pšenice sa porastom koncentracije boje (**tabela 6.16.**). Sa druge strane, stopa klijanja semena studije fitotoksičnosti biorazgradnih proizvoda je bila mnogo bolja, 100 %, izuzev za najvišu koncentraciju gde je bila 95 %. Dakle, dobijeni biorazgradni proizvodi ne utiču na klijanje semena *Triticum aestivum*, a pritom su doprineli i značajnijem rastu izdanka i korenčića. Nasuprot ovim rezultatima, polazni rastvori boje KV su uticali na smanjenje rasta i u dužini izdanka i u dužini korenčića u poređenju i sa kontrolnim uzorkom i sa svim uzorcima razgradnih proizvoda. Najbolji progres u dužini izdanka i korenčića ostvaren je pri koncentraciji od 0,005 g/l. Izdanci i korenčići nakon biorazgradnje su bili nekoliko puta duži u poređenju sa onim koji su bili izloženi početnom rastvoru boje, u proseku oko dva i po puta. U odnosu na kontrolni agarni uzorak, takođe je primećen porast dužine izdanka i korenčića. Najbolji rezultati su bili za koncentraciju 1 mg/l a porast je redom bio za 7 % i 4 %. Dakle, sve ove činjenice ukazuju na netoksičnost obezbojenih rastvora boje KV. Drugim rečima, radni rastvori boje KV su biorazgrađeni i detoksikovani pomoću metaboličke aktivnosti bakterijske kulture CKS7 i daju mogućnost obrađenoj otpadnoj vodi dalju eksploataciju u poljoprivrednom sektoru (na primer đubrenje zemljišta).

6.3.2. Biorazgradnja kristal violet boje sojem *Streptomyces microflavus* CKS6

6.3.2.1. Enzimski profil soja

Na osnovu analiza morfoloških karakteristika i homolognih sekvenci u NCBI Blast, radni mikroorganizam CKS6 je identifikovan kao *Streptomyces microflavus* vrsta. Komparativna analiza genomskih sekvenci 16S DNK pokazala je 99 % poklapanje sekvenci, a 16S rRNK kodirajuća sekvenca soja je deponovana pod kataloškim brojem KP715853.1 u NCBI GenBank. Slike izgleda nativnog i fiksiranog preparata soja CKS6 data su u prilogu 3 na **slici P-3.2.(a-b)**.

Za karakterizaciju profila ekstracelularnih enzima soja CKS6 korišćeni su isti testovi kao i kod soja CKS7: test za peroksidaze, lignin-peroksidazu, mangan-peroksidaze, lakazu i API-ZIM test. Rezultati ovih kvalitativnih testova prikazani su tabelarno u **tabelama 6.17. i 6.18.**

Table 6.17. Enzimski profil lignolitičkih enzima *Streptomyces microflavus* CKS6
























Enzim	Supstrat	Prisustvo
peroksidaze	pirogalol	+
lignin-peroksidaza	metilensko plava	+
mangan nezavisna/zavisna peroksidaza	fenol crvena	-/+
lakaza	ABTS/ α -naptol/ gvajakol	-/-/-

Na osnovu kvalitativnih testova, pokazano je da i bakterijska kultura CKS6, poseduje lignin peroksidazu, kao i mangan zavisnu peroksidazu, što predstavlja preduslov za njihovu potencijalnu primenu u biorazgradnji sintetičkih boja [197]. Što se tiče testa za enzim lakazu, bio je negativan primenom sva tri supstrata, ABTS-a, α -naptol i gvajakola (**tabela 6.17.**). Izostanak enzima lakaze ne predstavlja prepreku u primeni ovog mikroorganizma u biorazgradnji katjonskih boja. Ovaj enzim nije generalno prepoznat kao veoma značajan enzim koji je ključan za biorazgradnju pojedinih sintetičkih boja. Na primer, Zuka (*Zucca*) i saradnici (2012) su došli do zaključka da su azinske boje (Sarfranin T) otporne na delovanje ovog enzima [203].

API-ZIM test za karakterizaciju ekstracelularnih enzima soja CKS6 potvrdio je prisustvo nekih od enzima iz grupa: fosfataza, esteraza, amino peptidaza, proteaza i glikozil

hidrolaza. Od devetnaest testiranih hidrolitičkih enzima, CKS6 poseduje trinaest (**tabela 6.18.**) Bez obzira na to što je pokazano da soj CKS6 poseduje manji broj specifičnih enzima iz gore navedenih grupa u odnosu na soj CKS7, ipak se može smatrati da i ovaj mikroorganizam ima bogat enzimski profil. Takođe, ovi izolati se mogu smatrati potencijalnim izvorom i drugih biorazgradnih enzima, posebno onih koji hidrolizuju različita jedinjenja ugljenih hidrata [204].

Table 6.18. API-ZIM profil enzima *Streptomyces microflavus* CKS6

Fosfataze			Esteraze			Amino peptidaze			Proteaze			Glikozil hidrolaze						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
																		
Intenzitet:				Jak (4-5)			Srednji (2-3)			Mali (1)			Nije detektovan					

1: alkalna fosfataza; 2: kisela fosfataza; 3: naftol-AS-BI- fosfohidrolaza; 4: C4 esteraza; 5: C8 esteraza lipaza; 6: C14 lipaza; 7: leucin arilamidaza; 8: valin arilamidaza; 9: cistin arilamidaza; 10: tripsin; 11: α -chimotripsin; 12: α -galaktozidaza; 13: β -alaktoidaza; 14: β -glukuronidaza; 15: α -glukozidaza; 16: β -glukozidaza; 17: N-acetil- β -glukosaminidaza; 18: α -manozidaza; 19: α -fukozidaza.

Karakterizacija enzimskog profila ovih resursa, sojeva *Streptomyces* sp. CKS6 i CKS7, doprinosi razvoju mikrobne baze podataka. Pruža informacije o svojstvima i karakteristikama enzima ovih novih izolata u cilju njihove potencijalne industrijske i tehnološke primene. S obzirom na to da poseduju bogat enzimski profil, može se pretpostaviti i njihovo direktno i bezbedno odlaganje u životnu sredinu, doprinoseći sanaciji zemljišta i vode.

6.3.2.2. Uticaj procesnih parametara na biorazgradnju boje kristal violet

Procesne promenljive, u eksperimentima obezbojavanja vodenih rastvora boje KV pomoću bakterijske kulture CKS6, predstavljene su u **tabeli 6.19.** Odabrane su na osnovu pregleda literaturnih podataka vezanih za biološke tretmane obojenih otpadnih voda, ali veličina inokuluma, kao i uticaji brzine mešanja nisu razmatrani u ovim eksperimentima. Kako sama bakterijska kultura zahteva aeraciju tokom rasta, isto kao i CKS7, ovaj parametar mešanja bio je fiksiran na 120 rpm. Što se tiče veličine inokuluma, korišćen je

10 %. Ispitani su uticaji svakog pojedinačnog odabranog procesnog parametra na biorazgradnju boje, dok su ostali procesni parametri imali konstantnu vrednost (**Tabela 6.19.**).

Table 6.19. Procesne promenljive i njihove vrednosti u eksperimentima obezbojavanja rastvora boje kristal violet primenom soja *Streptomyces microflavus* CKS6

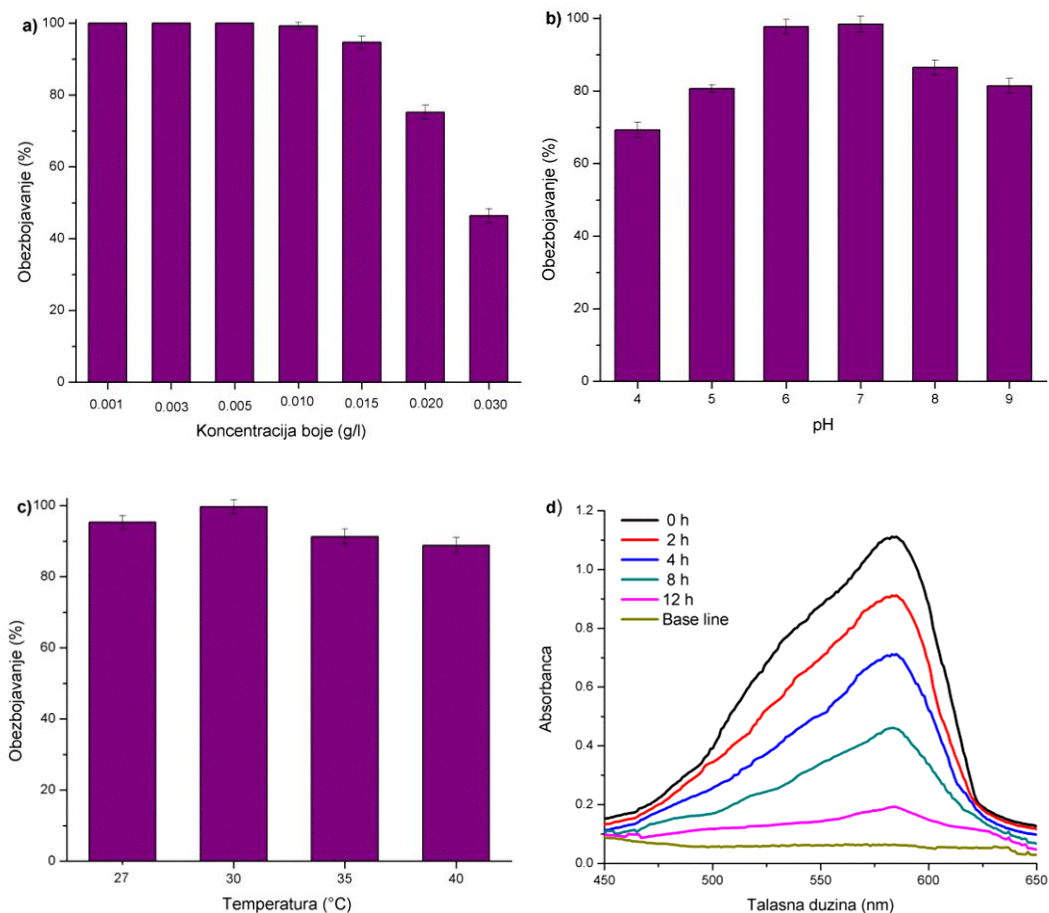
Faktori	Primenjene vrednosti						
Koncentracija boje KV (g/l)	0,001	0,003	0,005	0,010*	0,015	0,020	0,030
Temperatura (°C)	27	30*	35	40			
pH	4	5	6*	7	8	9	
Vreme trajanja procesa (h)	2	4	8	12*			

*:konstantna vrednost procesne promenljive pri ispitivanju uticaja drugih efekata.

Uticaj procesnih promenljivih na procenat obezbojavanja vodenog rastvora, predstavljen je na **slici 6.21.(a-d)**. Sa porastom početne koncentracije boje KV, zapaženo je da procenat obezbojavanja rastvora opada od 100 % do oko 47 % tokom dvanaestočasovnog delovanja bakterijske kulture CKS6 (**slika 6.21.a**). Sličnu sposobnost su pokazali i drugi mikroorganizmi, na primer *Pseudomonas desmolyticum* i *Sphingomonas paucimobilis*, tokom biorazgradnje drugih katjonskih boja [200, 205]. Do smanjenja procenta obezbojavanja verovatno dolazi i zbog toksičnog efekta boje pri relativno visokim koncentracijama koje utiču na smanjenje rasta bakterijske kulture i njihove metaboličke aktivnosti [196, 200]. Ipak, mnogo realniji uslovi u obojenim otpadnim vodama su takvi da sadrže manje koncentracije boja. U prilog tome ide i činjenica da pri niskim koncentracijama boje, enzimi lakše mogu da prepoznaju supstrat i budu efikasniji u svom delovanju [11].

Temperatura se smatra veoma značajnim procesnim parametrom koji ima veliki uticaj na biorazgradnju boje. Od temperature sredine, u kojoj se odigrava proces, zavisi kako rast i reprodukcija, tako i enzimska aktivnost mikroorganizama koji učestvuju u biorazgradnji boje [11, 107]. Uticaj temperature na odvijanje procesa biorazgradnje boje KV pomoću bakterijske kulture CKS6, predstavljen je na **slici 6.21.c**. Maksimalan procenat obezbojavanja rastvora boje, kao i kod primene soja CKS7, postignut je pri temperaturi od

30 °C. Ista ova temperatura je potrebna i bakterijskoj kulturi CKS6 da bi ostvarila svoj najbolji rast i reprodukciju u hranljivom medijumu.



Slika 6.21. Uticaj početne koncentracije boje (a), pH (b), temperature (c) i vremena trajanja procesa (d) na obezbojavanje rastvora boje kristal violet sa sojem *Streptomyces microflavus* CKS6

Pored toga, nešto malo manji procenat obezbojavanja je postignut pri temperaturi od 27 °C, dok su više temperature (35 °C i 40 °C) uticale na izraženije smanjenje obezbojavanja rastvora boje u odnosu na temperaturu od 30 °C. Dakle, uspešnost biorazgradnje boje KV bakterijskom kulturom CKS6 sa porastom temperature od 30 °C do 40 °C, opada za 11 %. U ovom opsegu ispitanih temperatura procesa, nema termičke inaktivacije enzimske aktivnosti, što ukazuje na povoljnost operativnih uslova na proces

biorazgradnje boje. Pored ovoga, ovakvi rezultati uticaja temperature predstavljaju veoma korisnu informaciju za primenu ovog soja u procesu prečišćavanja otpadnih voda. Blaži operativni uslovi doprinose smanjenju velikih troškova tokom obrade otpadne vode, što je u skladu sa strategijom održivog razvoja. Na sličan način, uticaj temperature se pokazao kao značajni faktor na procenat obezbojavanja rastvora malahit zelene pomoću *Sphingomonas paucimobilis* [111] i *Cosmarium* sp. [9], kao i da su se korišćeni mikroorganizmi, na širokom temperaturnom opsegu, prilagodili biorazgradnji boje.

Najpovoljniji operativni uslovi pH, za uspešan biološki tretman uklanjanja boje iz otpadnih voda pomoću bakterija, su najčešće neutralnih ili blago alkalnih uslova. Efikasnost obezbojavanja naglo opada pri jako alkalnim ili jako kiselim uslovima sredine. U skladu sa ovim, obojene otpadne vode se uglavnom puferišu kako bi se poboljšao uspeh mikrobne kulture u biorazgradnji boje [11, 107]. Uticaj početne pH vodenih rastvora boje (4-9) na biorazgradnju boje KV su predstavljeni na **slici 6.21.b**. Uslovi jako kiselih (2-3) i jako baznih (10-12) uslova pH nisu istraživani jer pri ovim ekstremnim uslovima sredine, bakterijska kultura CKS6 nije sposobna da raste, a samim tim i da biorazgradi boju KV. Maksimalna efikasnost obezbojavanja rastvora boje postignuta je pri početnoj pH vrednosti medijuma od 6 i 7. Kiseliji uslovi su bili najnepovoljniji za proces biorazgradnje boje dok su, u odnosu na ove, alkalniji uslovi bili povoljniji. I u drugim istraživanjima, bakterijska biorazgradnja trifenilmetanskih boja (KV i malahit zelena) je favorizovana u neutralnim ili baznim uslovima rastvora boje, a dostignuti maksimum je bio pri pH 9 [9, 111, 206]. Pri nižim pH vrednostima, postoji mogućnost da se H^+ joni takmiče sa katjonima boje i da tako utiču na smanjenje efikasnosti obezbojavanja rastvora [111], dok je visoka pH verovatno uticala na denaturaciju enzima bakterijske kulture CKS6, što je doprinelo smanjenju njihove aktivnosti. Takođe, optimalna pH hranljivog medijuma za rast CKS6 je između 6 i 7, tako da puferisanje vodenih rastvora nije neophodno za unapređenje performansa u uklanjanju boje. U prilog ovome ide i činjenica da se i same otpadne vode neutrališu pre ispuštanja u životnu sredinu. Nakon procesa biorazgradnje, pH vrednosti radnih rastvora su se neznatno menjali, tako de je obezbojavanje rastvora boje bilo usled delovanja mikroorganizama, a ne usled promene pH.

Na osnovu **slike 6.21.d** može se zaključiti da je bakterijskoj kulturi CKS6 potrebno do 12 h da potpuno obezboji rastvor boje KV koncentracije 0,010 g/l. Smanjenje koncentracije boje praćeno je, u određenim vremenskim intervalima, snimanjem spektara talasnih dužina 300-750 nm. Duž celog snimljenog spektra, nije došlo do pojave novih pikova tokom procesa biorazgradnje, već se postojeći vrh pik za KV (584 nm) smanjivao postepeno sa vremenom. Na **slici 6.21.d.** je, radi preglednosti, prikazan samo deo snimljenog spektra (450-650 nm), kao i odabrani vremeski periodi u kojima su spektri nastali (0 h, 2 h, 4 h, 8 h i 12 h). Takođe, ispitano je koliko je bakterijskoj kulturi CKS6 potrebno da obezboji sve ostale odabrane početne koncentracije rastvora boje KV. Pa tako, za koncentracije od 0,001 g/l, 0,003 g/l, 0,005 g/l, 0,01 5g/l, 0,020 g/l i 0,030 g/l, redom je bilo potrebno 2,5 h, 3,5 h, 5 h, 18 h, 24 h i 34 h. Pošto biorazgradnja boje zavisi i od izbora mikrobnog organizma i od njenog afiniteta prema specifičnoj strukturi boje, tako su i izveštaji o trajanju procesa biorazgradnje, u skladu sa pomenutim, različiti. Na primer, biorazgradnja KV boje pomoću *Staphylococcus epidermidis* trajala je dva puta duže u poređenju sa delovanjem bakterijske kulture CKS6 [4]. Takođe, bakterijska kultura CKS6 bila je efikasnija u obezbojavanju rastvora KV boje od *Fusarium solani*, gde je ovom mikroorganizmu trebalo 48 h da biorazgradi boju koncentracije 25 mg/l [107]. Ako se uporedi efikasnost soja CKS7 u odnosu na soj CKS6, za obezbojavanje radnih rastvora koncentracije 0,005 g/l, bakterijska kultura CKS6 je višestruko efikasnija. Za biorazgradnju rastvora boje KV koncentracije 0,005 g/l, bilo joj je potrebno sedam puta kraće vreme.

U daljim eksperimentima biorazgradnje, ispitana je mogućnost biorazgradnje adsorbovane boje KV na aktivirane repine rezance, boje ST i realne otpadne vode, koja je prikupljena nakon bojenja mikroorganizama, korišćenjem bakterijske kulture CKS6.

6.3.2.3. *Fitotoksičnost biorazgradnih proizvoda*

Studija fitotoksičnosti boje KV, pre i nakon biorazgradnje, je urađena sa aspekta bezbednosti primene bakterije CKS6 u biološkim tretmanima obojenih otpadnih voda. Rezultati osetljivosti semena pšenice *Triticum aestivum* na prisustvo boje KV i njenih razgradnih proizvoda, predstavljeni su u **tabeli 6.20**.

Studija fitotoksičnosti je pokazala dobru stopu klijanja semena pšenice, kao i značajan rast u dužini izdanaka i korenčića u svim uzorcima dobijenim nakon biorazgradnje. Nasuprot ovim rezultatima, polazni rastvori boje KV su smanjili stopu klijanja semena, kao i dužinu izdanaka i korenčića (**tabela 6.20.**).

Table 6.20. Studija fitotoksičnosti boje kristal violet i njenih razgradnih proizvoda pomoću semena *Triticum aestivum*

P	KAM	Boja KV/razgradni proizvodi		
		0,001 g/l	0,005 g/l	0,010 g/l
RIKS	100	95 ^a /100 ^b	85 ^a /100 ^b	85 ^a /95 ^b
I	3,02±0,09	2,28±0,34 ^a /3,32±0,42 ^b	1,98±0,40 ^a /3,13±0,29 ^b	1,69±0,55 ^a /3,19±0,19 ^b
K	1,12±0,29	0,93±0,32 ^a /1,28±0,26 ^b	0,88±0,62 ^a /1,28±0,39 ^b	0,71±0,33 ^a /1,24±0,38 ^b

P: Parametri;

RIKS: Relativni indeks klijanja semena (%);

I: Dužina izdanaka (cm);

K: Dužina korenčića (cm);

KAM: Kontrolni agar medijum;

^a: pre biorazgradnje;

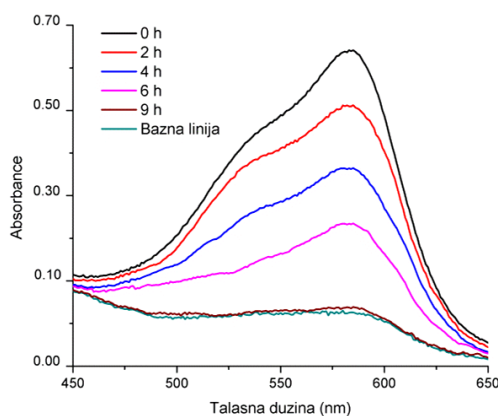
^b: nakon biorazgradnje.

Veoma značajan doprinos biorazgradnje boje KV bakterijom CKS6 je taj da su razgradni proizvodi boje dopineli značajnijem rastu korenčića i izdanaka i to za nekoliko procenata više u odnosu na kontrolni agar medijum i za nekoliko desetina procenata više u odnosu na rastvore boje KV. Dakle, svi rezultati studije fitotoksičnosti su pokazali netoksičnost biorazgradnih proizvoda boje KV. U vezi s tim, radni rastvori KV boje su biorazgrađeni i detoksikovani pomoću CKS6 bakterijske kulture i omogućavaju tretiranoj otpadnoj vodi dalju eksploataciju u poljoprivrednom sektoru.

6.3.2.4. Biorazgradnja boje adsorbovane na aktivirane repine rezance

U ovom delu istraživanja, za potrebe biorazgradnje adsorbovane boje KV, boja je adsorbovana na aktivirane repine rezance sa kapacitetom od 11,960 mg/g. Jedina procesna promenljiva, koja je varirana u ovim eksperimentima, je odnos ISP1 medijuma (dodat kao izvor azota) i fiziološkog rastvora u radnom medijumu.

Na početku procesa biorazgradnje, javlja se blaga obojenost radnih medijuma usled desorpcije čestica boje adsorbovane na površini rezanaca. Dakle, usled gradijenta koncentracije između tečne i čvrste faze, koji nastoji da bude podeljen, boja se desorbuje sa površine adsorbenta u rastvor. Nakon 4 h, kada se koncentracija ISP1 radnog medijuma kretala od 10 % do 100 %, procenat uklanjanja boje je neznatno opao od 49 % do 47 %. Kada se koncentracija ISP1 radnog medijuma kretala 0 % i 5 %, rezultati biorazgradnje nisu bili zadovoljavajući. Na osnovu ovako dobijenih rezultata, ustanovljeno je da bakterijskoj kulturi CKS6, tokom procesa biorazgradnje boje KV, nije potreban 100 % ISP1 radni medijum, već joj je dovoljan i njegov udeo od 10 %. Na **slici 6.22.** prikazan je vremenski tok obezbojavanja radnog medijuma (10 % ISP1) preko UV-VIS spektara. Nakon 9 h, sva boja, adsorbovana na aktivirane repine rezance je biorazgrađena, jer su radni medijum, adsorbent i ćelije bakterijske culture bili potpuno obezbojeni. Vrhovi spektara su se tokom ovog vremenskog perioda proporcionalno smanjivali i glavni apsorpcioni vrh je nestao u potpunosti, verovatno usled razgradnje molekula boje.



Slika 6.22. Vremenski tok razgradnje boje kristal violet pomoću soja *Streptomyces microflavus* CKS6.

Uspešnost biorazgradnje adsorbovane boje KV na aktivirane repine rezance, pruža mogućnost da se kombinovanim procesima adsorpcije (*in situ*) i biorazgradnje bakterijskom kulturom CKS6 (*ex situ*) potpuno obradi obojena otpadna voda. Adsorbent bi nakon biorazgradnje bio regenerisan i mogao bi se ponovo iskoristiti za istu svrhu na

izvoru zagađenja (otpadne vode korisnika boje KV) uz prethodno sušenje na sobnoj temperaturi.

6.3.3. Mogućnost ponovne upotrebe bakterijskih kultura za biorazgradnju boje kristal violet

S obzirom na to da su obe bakterijske kulture vrste roda *Streptomyces* potpuno obezbojile rastvore boje KV, ispitan je i potencijal njihove ponovne primene za istu svrhu na sličan način. Adaptirane kulture CKS6 i CKS7 (10 % inokulum) su presejane iz obezbojenih rastvora početne koncentracije 0,005 g/l u nove rastvore boje koncentracije 0,005 g/l. U oba slučaja, u drugom ciklusu obezbojavanja, primećeno je da je njihova efikasnost, u trajanju od 5 h za CKS6 i 36 h za CKS7, bila manja i iznosile su redom oko 97 % i oko 95 % (tabela 6.21.). Dakle, obe bakterijske kulture se mogu ponovo koristiti za biorazgradnju boje KV, ali im je za to potrebno više vremena nego što je to bilo potrebno u prvom ciklusu obezbojavanja.

Tabela 6.21. Obezbojavanje rastvora boje kristal violet (0,005 g/l) neprilagođenim i prilagođenim mikroorganizmima

Parametar	Vrste roda <i>Streptomyces</i>			
	CKS6		CKS7	
	Ciklus I	Ciklus II	Ciklus I	Ciklus II
Obezbojavanje (%)	100	97,2	100	95,3

CKS6: *Streptomyces microflavus* CKS6;

CKS7: *Streptomyces fulvissimus* CKS7.

6.3.4. Biorazgradnja boje safranin T sojem *Streptomyces microflavus* CKS6

U mikrobiološkoj laboratoriji se svakodnevno generiše obojena otpadna voda nakon bojenja mikrobioloških preparata po gramu za njihovo mikroskopsko posmatranje. Pored boje KV, prilikom bojenja koristi se i boja safranin T (ST). Sa idejom da se ovako nastala otpadna voda biorazgradi, ispitana je biorazgradna moć soja *Streptomyces microflavus* CKS6 za boju ST, na isti način kao i kod primene boje KV. Ovaj soj je odabran jer je pokazao veću biorazgradnu moć za boju KV u odnosu na soj *Streptomyces fulvissimus* CKS7. Definisani su i analizirani uslovi maksimalne biorazgradnje boje ST sojem CKS6 i ispitana je fitotoksičnost nastalih biorazgradnih proizvoda.

6.3.4.1. Uticaj procesnih parametara na biorazgradnju boje safranin T

U otpadnoj vodi koja je nastala nakon bojenja mikroorganizama, nalazi se smeša dve boje, KV i ST. U cilju da se ispita mogućnost biorazgradnje ove otpadne vode, najpre mora da se ustanovi da li je bakterijska kultura CKS6 sposobna da biorazgradi i boju ST, podjednako dobro kao i boju KV. Ispitani su uticaji istih procesnih promenljivih (**tabela 6.22.**), kao i u slučaju obezbojavanja rastvora boje KV bakterijskom kulturom CKS6, a rezultati su predstavljeni na **slici 6.23.(a-d)**.

Table 6.22. Procesne promenljive i njihove vrednosti u eksperimentu obezbojavanja rastvora boje safranin T sa *Streptomyces microflavus* CKS6

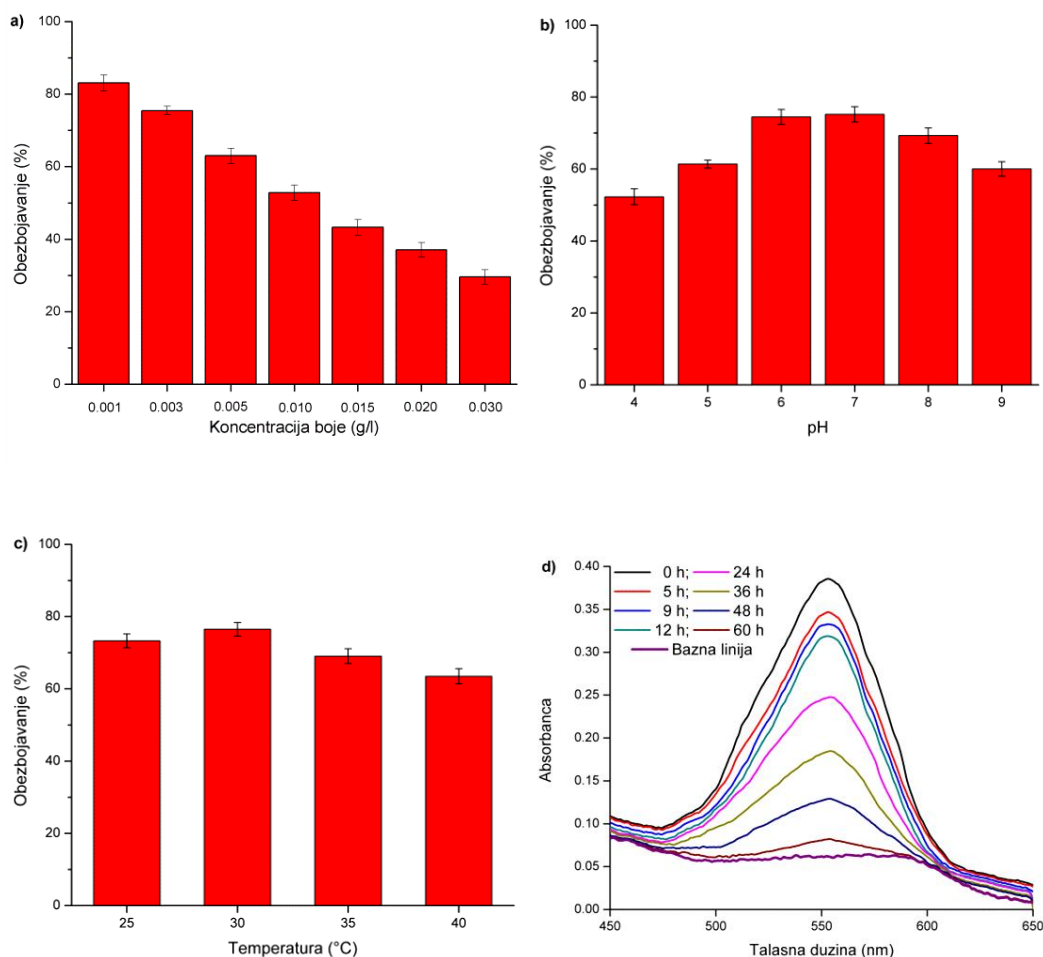
Procesne promenljive	Primenjene vrednosti						
	0,001	0,003*	0,005	0,010	0,015 [#]	0,020	0,030
Koncentracija boje ST (g/l)	0,001	0,003*	0,005	0,010	0,015 [#]	0,020	0,030
Temperatura (°C)	27	30*	35	40			
pH	4	5	6*	7	8	9	
Vreme trajanja procesa (h)	5	9	12	24*	36	48	60

*: konstantna vrednost procesne promenljive pri ispitivanju uticaja drugih efekata;

[#]: vrednost koncentracije boje tokom ispitivanja vremenskog toka obezbojavanja.

Sa porastom početne koncentracije boje ST, procenat obezbojavanja rastvora opada kao i kod primene KV boje. Tokom dvadesetčetvoročasovnog delovanja bakterijske kulture CKS6, procenat obezbojavanja kretao se od 81,14 % do 29,65 % (**slika 6.23.a**) i u odnosu

na boju KV, uspeh obezbojavanja je bio niži za oko 17 %. Takođe se može primetiti da je sa porastom koncentracije boje KV procenat uklanjanja opao 2,5 puta, dok je kod primene boje ST opao oko 2,8 puta. Dakle, bakterijska kultura CKS6 je bila efikasnija u obezbojavanju boje KV. Do smanjenja stepena obezbojavanja verovatno dolazi zbog toksičnog efekta boje ST pri relativno visokim koncentracijama. Visoka koncentracija boje utiče verovatno i na smanjenje rasta bakterije i na njihovu metaboličku aktivnost [196] jer pri niskim koncentracijama boje, enzimi bakterije lakše prepoznaju supstrat i bivaju efikasnije u svom delovanju [11].



Slika 6.23. Uticaj početne koncentracije boje (a), pH (b), temperature (c) i vremena trajanja procesa (d) na obezbojavanje rastvora boje safranin T pomoću *Streptomyces microflavus* CKS6

Uticaoj temperature na odvijanje procesa biorazgradnje boje ST pomoću bakterijske kulture CKS6, predstavljen je na **slici 6.23.c**. Maksimalan procenat obezbojavanja rastvora boje postignut je pri temperaturi od 30 °C, dok je nešto malo manji procenat obezbojavanja postignut pri temperaturi od 27 °C. Izraženije smanjenje obezbojavanja rastvora boje je bilo pri višim testiranim temperaturama. Smanjenje efikasnosti obezbojavanja boje ST sa porastom temperature od 30 °C do 40 °C, je bilo oko 17 %. Dakle, u ispitanom temperaturnom opsegu procesa, nema termičke inaktivacije enzimske aktivnosti. Identičan oblik ponašanja bakterijske kulture CKS6 bio je i kada je obezbojavala rastvor boje KV. U vezi s tim, da bi bakterija mogla istovremeno da biorazgradi smešu boje KV i ST, potrebno je i da uslovi pH u rastvoru budu slični. Uticaj početne pH (4-9) na obezbojavanje rastvora boje ST predstavljeni su na **slici 6.23.b**. Maksimalna efikasnost obezbojavanja postignuta je pri početnoj pH vrednosti medijuma od 6 i 7, dok su kiseliji uslovi bili najnepovoljniji za proces. Dakle, identično ponašanje bakterije je bilo i kada je u rastvoru bila KV boja. Takođe, pH vrednosti radnih rastvora su se neznatno menjale tokom biorazgradnje, što govori da je obezbojavanje rastvora boje bilo usled delovanja mikoorganizama, a ne usled promene pH.

Vremenski tok obezbojavanja rastvora boje ST koncentracije 0,015 g/l je predstavljen na **slici 6.23.d**, a ova koncentracija je odabrana iz razloga jer se u otpadnim vodama nakon brojanja mikoorganizama nalazi približno ova količina boje. Bakterijskoj kulturi CKS6 bilo je potrebno oko 60 h da potpuno obezboji ovaj rastvor boje ST. Postojeći vrh pika za ST (554 nm) vremenom se postepeno smanjivao i duž celog snimljenog spektra nije došlo do pojave novih pikova tokom procesa biorazgradnje. Takođe, ovde je ispitano i koliko je bakterijskoj kulturi CKS6 bilo potrebno da obezboji sve ostale odabrane rastvore boje ST. Pa tako, za koncentracije od 0,001 g/l, 0,005 g/l, 0,010 g/l i 0,015 g/l, redom je bilo potrebno 30 h, 36 h, 42 h i 60 h, dok je za najkoncentrovanije radne rastvore boje (0,020 g/l i 0,030 g/l) bilo potrebno više od tri dana. Ako se uporedi efikasnost bakterijske kulture CKS6 u obezbojavanju rastvora boja KV i ST, daleko je bila uspešnija i brža u obezbojavanju boje KV.

6.3.4.2. Fitotoksičnost biorazgradnih proizvoda

Proverena je fitotoksičnost boje ST pre i nakon biorazgradnje, sa istim ciljem kao i u slučaju primene boje KV. Rezultati osetljivosti semena pšenice *Triticum aestivum* na prisustvo boje ST i njenih razgradnih proizvoda, predstavljenisu u **tabeli 6.23**.

Studija fitotoksičnosti razgradnih proizvoda boje ST je pokazala dobru stopu klijanja semena pšenice, kao i značajan rast u dužini izdanka i korenčića. Takođe je primećen značajan doprinos biorazgradnje boje ST bakterijskom kulturom CKS6 jer su razgradni proizvodi doprineli značajnijem rastu korenčića i izdanka i to za nekoliko procenata više u odnosu na kontrolni agar medijum.

Table 6.23. Studija fitotoksičnosti boje safranin T i njenih razgradnih proizvoda pomoću semena *Triticum aestivum*

P	KAM	Boja ST/razgradni proizvodi		
		0,005 g/l	0,010 g/l	0,015 g/l
RIKS	100	95 ^a /100 ^b	85 ^a /95 ^b	80 ^a /95 ^b
I	3,08±0,05	2,08±0,24 ^a /3,22±0,33 ^b	1,86±0,47 ^a /3,12±0,26 ^b	1,55±0,54 ^a /3,04±0,68 ^b
K	1,17±0,21	0,87±0,26 ^a /1,23±0,24 ^b	0,79±0,26 ^a /1,14±0,34 ^b	0,49±0,18 ^a /1,06±0,33 ^b

P: Parametri;

RIKS: Relativni indeks klijanja semena (%);

I: Dužina izdanka (cm);

K: Dužina korenčića (cm);

KAM: Kontrolni agar medijum;

^a: pre biorazgradnje;

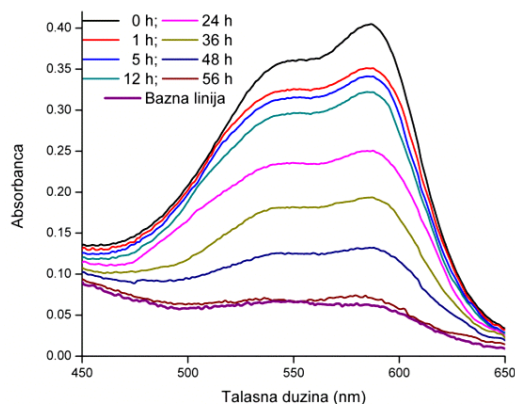
^b: nakon biorazgradnje.

Studija fitotoksičnosti razgradnih proizvoda boje ST je pokazala dobru stopu klijanja semena pšenice, kao i značajan rast u dužini izdanka i korenčića. Takođe je primećen doprinos biorazgradnje boje ST bakterijskom kulturom CKS6 jer su razgradni proizvodi doprineli značajnijem rastu korenčića i izdanka i to za nekoliko procenata više u odnosu na kontrolni agar medijum. U poređenju sa doprinosom razgradnih proizvoda boje KV, dužina rasta izdanaka bila je manja za oko 3 %, a dužina rasta korenčića opadala je uporedo sa rastom koncentracije za oko 4 %, 8 % i 17 %. Što se tiče uticaja polaznih rastvora boje ST, oni su pokazali smanjenje i u stopi klijanja semena, kao i u dužini

izdanka i korenčića (tabela 6.23.). Svi rezultati studije fitotoksičnosti su pokazali netoksičnost razgradnih proizvoda boje ST i može se zaključiti da su radni rastvori ST boje biorazgrađeni i detoksikovani pomoću bakterijske kulture CKS6.

6.3.5. Biorazgradnja otpadne vode nastale nakon bojenja mikroorganizama

Nakon prethodno ispitanih uslova i postizanja maksimalne efikasnosti obezbojavanja pojedinačnih rastvora boja KV i ST bakterijskom kulturom CKS6, stekli su se uslovi da se ispita mogućnost obezbojavanja realnog sistema. Otpadna voda je sakupljena u mikrobiološkoj laboratoriji tokom bojenja preparata po gramu za mikroskopsko posmatranje mikroorganizama. Dobijena frakcija je najpre sterilisana u autoklavu, a potom i rastvorena, u sterilnim uslovima, u ISP1 medijumu pH 6,5 (odnos tečno tečne faze (1:10)). Treba napomenuti i to, da svaki put kad se boje mikroorganizmi, koncentracija obe boje u sakupljenoj frakciji varira. U njoj se pored boja nalazi i lugolov ratvor i alkohol, takođe različitih koncentracija. Dobijena smeša je potom analizirana spektrofotometrijski i snimljeni spektar je pokazao dva pika (na 554 nm i 584 nm), kao što je i očekivano. Vremenski tok obezbojavanja smeše bakterijskom kulturom CKS6 na temperaturi od 30 °C predstavljen je na slici 6.24.



Slika 6.24. Vremenski tok biorazgradnje realnog sistema sa *Streptomyces microflavus* CKS6 (30 °C, pH 6,5)

Bakterijskoj kulturi CKS6 bilo je potrebno 56 h da potpuno obezboji smešu boja KV i ST (slika 6.24.). Zabeleženi apsorpcioni pikovi na 584 nm (maksimalna talasna dužina za boju KV) i 554 nm (maksimalna talasna dužina za boju ST), snimljeni pre procesa obezbojavanja (0 h), su potpuno nestali nakon 56 h od početka procesa. Takođe, nije zabeleženo nikakvo pomeranje vrha ova dva početna pika tokom trajanja procesa obezbojavanja. Tokom trajanja procesa, obe boje su se međusobno „takmičile“ i donekle ometale normalni tok biorazgradnje. U vezi s tim, proces je trajao nešto duže nego što je očekivano. Proces obezbojavanja je napredovao tako što su boje naizmenično biorazgrađivane, a ne jedna do potpune biorazgradnje pa zatim druga boja. Takođe, primećeno je da je tokom procesa bio prisutan normalan rast bakterijske kulture CKS6. Aktivnost enzima lignin-peroksidaze i mangan zavisne peroksidaze se povećala redom za oko 8 i 2,3 puta nakon završenog procesa biorazgradnje. Dakle, bakterijska kultura CKS6 je sposobna da obezboji prikupljenu otpadnu vodu nakon bojenja mikroorganizama i pruža mogućnost da se u budućnosti primenjuje za ovu svrhu. Svakako treba proces optimizovati u smislu korišćenja dodatka hranljivog ISP1 medijuma tokom biorazgradnje.

6.3.6. Mehanizam biorazgradnje katjonskih boja bakterijskim kulturama roda *Streptomyces*

6.3.6.1. Mehanizam biorazgradnje boje kristal violet

Obezbojavanje rastvora boje KV pomoću vrste roda *Streptomyces*, CKS6 i CKS7, može se odvijati na dva načina: adsorpcijom boje na površini biomase živih mikroorganizama i/ili biorazgradnjom boje aktivnošću enzima bakterijskih kultura [9, 107, 112].

Na početku procesa obezbojavanja radnih rastvora, uočeno je da su ćelije mikroorganizama postale intenzivno obojene u ljubičasto. Evidentno je da je obojenost ćelija bila usled adsorpcije boje na njihovoj površini. Uporedo sa adsorpcijom boje, radni rastvori su postali bezbojniji, a kako je ranije opisano, stopa obezbojavanja zavisila je od koncentracije početnog rastvora. Ovakav adsorpcioni mehanizam izgleda slično mnogim drugim mehanizmima za uklanjanje boje fizičkom adsorpcijom [111, 207]. Drugim rečima,

tokom adsorpcije, boja KV se koncentriše na biomasi, koja sa vremenom postaje progresivno zasićena. Proces adsorpcije je potvrđen apsorpcionim spektrima, čiji su se vrhovi proporcionalno smanjivali. Nakon adsorpcije, usledila je biorazgradnja boje, što se ispoljilo u velikom praznom hodu do prvog sledećeg apsorpcionog pika, kada je ponovo usledila adsorpcija. Do kraja trajanja procesa obezbojavanja rastvora, adsorpcija i biorazgradnja su se naizmenično smenjivale, sve dok najveći pik nije potpuno nestao. Na kraju, i sve bakterije i radni rastvor su bili obezbojeni. Pored toga, nema pojave novih apsorpcionih pikova u obezbojenom medijumu, što ukazuje da su mikroorganizmi, CKS6 i CKS7 potpuno razgradili molekul boje KV i verovatno ga iskoristili za svoj rast (izvor ugljenika i azota) [208]. Takođe, bilo je očigledno i da se stopa obezbojavanja rastvora povećala uporedo sa eksponencijalnim rastom bakterija. Njihov broj, u obezbojenom medijumu, bio je vidno uvećan. Treba napomenuti da tokom procesa obezbojavanja pomoću ovih bakterijskih kultura, nije bilo značajnih promena pH vrednosti radnih rastvora, što potvrđuje pretpostavku da je uklanjanje boje usledilo aktivnošću mikroorganizama. U vezi s tim, uklanjanje boje KV iz radnih rastvora, verovatno se postiže u dva koraka: vezivanje (adsorpcija) boje na površini ćelija bakterijskih kultura koju prati biorazgradnja boje bakterijskim enzimima. Po istom obrascu se razgrađivala boja KV delovanjem *Citrobacter sp.* [112].

Promene enzimske aktivnosti lignin i mangan zavisne peroksidaze, koje su uglavnom uključene u proces biorazgradnje boje, pre i nakon procesa, predstavljene su u **tabeli 6.24**.

Kvantitativna analiza enzimske aktivnosti je potvrdila povećanje lignin peroksidazne aktivnosti nakon biorazgradnje boje KV, što ukazuje na njen značajan udeo tokom biorazgradnje (**Tabela 6.24**). U drugim studijama se, takođe, pretpostavlja da je ovaj enzim odgovoran za raspad molekula boje za tekstil [198, 199, 203].

Tabela 6.24. Aktivnosti lignolitičkih enzima sojeva roda *Streptomyces* pre i nakon procesa biorazgradnje boje kristal violet

Uzorak	Enzimska aktivnost	
	Lignin peroksidaza, %	Mangan zavisna peroksidaza, U/l
Početni medijum CKS6 [*]	1,51 ± 0,23	0,91 ± 0,17
Početni medijum CKS7 ^{**}	1,43 ± 0,41	0,88 ± 0,23
Krajnji medijum CKS6 ^a	13,46 ± 0,67	3,45 ± 0,24
Krajnja medijum CKS7 ^b	9,89 ± 0,34	2,04 ± 0,11

^{*}: Radni medijum *Streptomyces microflavus* CKS6 pre biorazgradnje;

^{**}: Radni medijum *Streptomyces fulvissimus* CKS7 pre biorazgradnje;

^a: Radni rastvor KV 0,0001 g/l nakon biorazgradnje sa *Streptomyces microflavus* CKS6;

^b: Radni rastvor KV 0,0001 g/l nakon biorazgradnje sa *Streptomyces fulvissimus* CKS7.

6.3.6.2. Mehanizam biorazgradnje boje safranin T

Obezbojavanje rastvora boje ST pomoću bakterijske kulture CKS6 se odvijalo na identičan način kao i u slučaju biorazgradnje boje KV. Dakle, mogući mehanizam obezbojavanja radnih rastvora boje ST verovatno se postiže u dva koraka: adsorpcija boje na površinu bakterijskih ćelija i biorazgradnja boje bakterijskim enzimima. Na početku procesa obezbojavanja, uočena je obojenost bakterijskih ćelija u svetlo crveno, dok je na kraju procesa obojenost, kako bakterija tako i radnih rastvora, nestala. Stopa obezbojavanja rastvora povećala se uporedo sa eksponencijalnim rastom bakterija, čiji se broj u obezbojenom medijumu povećao. Takođe nije zabeležena ni značajna promena pH vrednosti radnih rastvora nakon završetka procesa, što potvrđuje pretpostavku da je obezbojavanje posledica aktivnosti mikroorganizama. Promene enzimske aktivnosti lignin i mangan zavisne peroksidaze, pre i nakon procesa biorazgradnje, predstavljene su u **tabeli 6.25.**

Tabela 6.25. Aktivnosti lignolitičkih enzima *Streptomyces microflavus* CKS6 pre i nakon procesa biorazgradnje boje safranin T

Uzorak	Enzimska aktivnost	
	Lignin peroksidaza, %	Mangan zavisna peoksidaza, U/l
Početni medijum ^a	1,51 ± 0,23	0,91 ± 0,17
Krajnji medijum ^b	3,35 ± 0,35	1,55 ± 0,17

^a: Radni medijum kulture pre biorazgradnje;

^b: Radni rastvor boje ST 0,005 g/l nakon biorazgradnje.

Kvantitativna enzimska analiza je otkrila povećanje lignin i mangan zavisne peroksidazne aktivnosti nakon biorazgradnje boje ST, koja podrazumeva njihov značajan udeo tokom biorazgradnje (**Tabela 6.25.**) [199, 203]. Povećanje lignin peroksidazne aktivnosti tokom biorazgradnje ST boje, bilo je niže u poređenju sa aktivnostima tokom primene KV boje. Isto ponašanje je primećeno i u slučaju mangan peroksidaze. U vezi s tim je verovatno i bakterijskoj kulturi bilo potrebno više vremena da biorazgradi boju ST u odnosu na boju KV.

6.4. ADSORPCIJA ENZIMA CELULAZE NA OTPADNU KAFU

Ispitana je mogućnost iskorišćenja otpadne kafa, nastale konzumiranjem napitka, kao adsorbenta u procesima biosorpcije enzima. Mineralni sastav ovog nus-proizvoda pokazuje prisustvo značajne koncentracije kalijuma, koji je poznat kao aktivator enzima iz grupe celulaza. U osnovi, ovo je i celulozni otpadni materijal i kao takav predstavlja prirodni supstrat za koji se vezuju enzimi ove grupe i na koji deluju. Imobilizacijom celulaza na otpadnoj kafi bi se mogli izbeći skupi postupci taloženja i razdvajanja ovih enzima iz sirove fermentacione tečnosti. Otpadna kafa sa imobilisanom celulazom bi mogla biti korišćena kao komponenta stočne hrane, zahvaljujući svom povoljnom nutritivnom sastavu i enzimskom potencijalu..

U vezi sa tim, ispitana je mogućnost vezivanja celulaza na nosaču pripremljenom od otpadne kafe, tokom vremena, po postupku opisanom u odeljku 5.1.3. Nakon pripreme nosača, urađena je karakterizacija njihove površine postupcima opisanim u odeljku 5.3. Analizirana je efikasnost imobilizacije enzima preko dva definisana parametra: prinos i efikasnost imobilizacije (%) i definisani su najbolji uslovi modifikacije najuspešnijeg nosača od otpadne kafe. Ispitivanjem kinetike procesa adsorpcije određen je model i aproksimiran mehanizam reakcije. Na kraju je ispitana efikasnost imobilizacije enzima celulaze iz sirove fermentacione tečnosti soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, uz ispitivanje kinetike procesa.

6.4.1. Adsorpcija komercijalne celulaze poreklom iz *Trichoderma reesei*

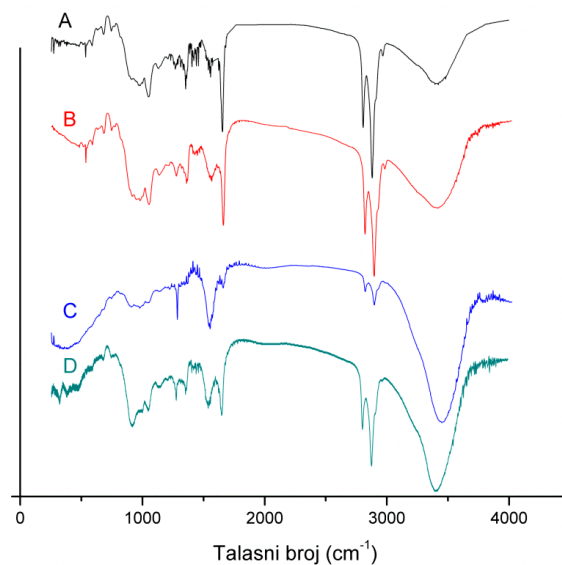
Proces adsorpcije komercijalne celulaze iz *Trichoderma reesei* je posmatran na tri različita nosača nastalih modifikacijom otpadne kafe: otpadna kafa-GIA, otpadna kafa-ClO₂ i otpadna kafa-H₂O₂. Definisane su fizičko-hemijske karakteristike nosača kao i način pripreme najpodesnijeg nosača za imobilizaciju komercijalnog enzima. Adsorpcija enzima je potvrđena analizom FTIR spektra otpadne kafe-ClO₂ nakon završetka procesa imobilizacije.

6.4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike modificovanih adsorbenata

Analiza fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenata (nosača) komercijalnog enzima celulaze od otpadne kafe, urađena je FTIR i SEM tehnikom gde su definisane osnovne površinske funkcionalne grupe i izgled i struktura aktivne površine. Naelektrisanje površinskih funkcionalnih grupa određeno je pomoću tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka).

6.4.1.1.1. Analiza površinskih funkcionalnih grupa

Za procenu i razumevanje stepena modifikacije otpadne kafe odabranim aktivacionim agensima, FTIR spektri otpadne kafe i modificovanih nosača od otpadne kafe prikazani su na **slici 6.25**.



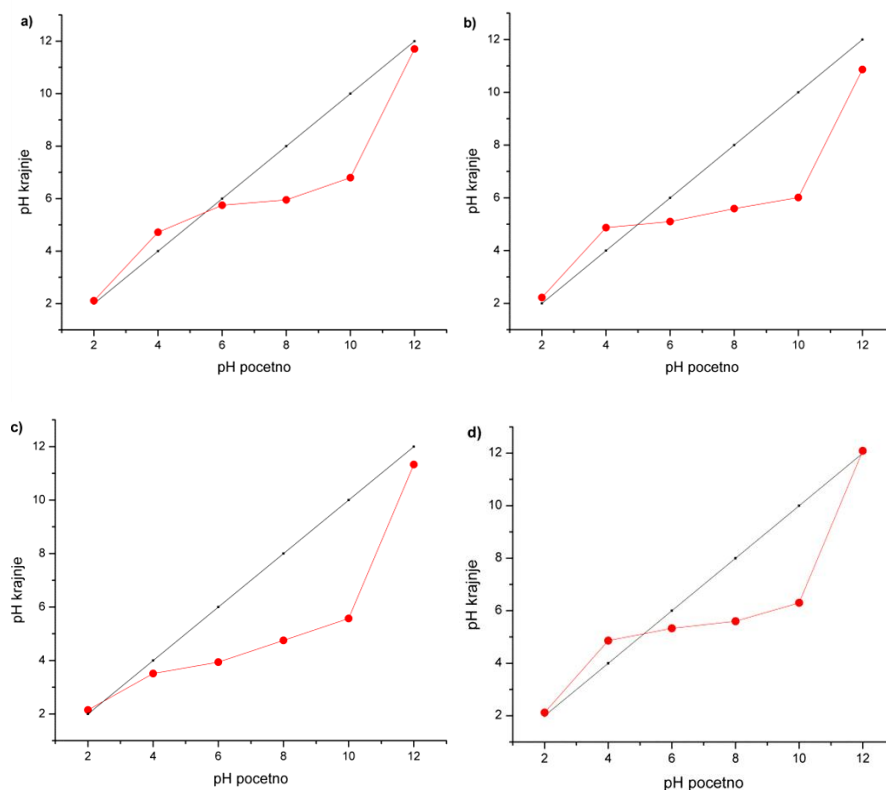
Slika 6.25. FTIR spektar otpadne kafe (A), otpadna kafa-GlA (B), otpadna kafa-ClO₂ (C) i otpadna kafa-H₂O₂ (D)

Upoređivanjem FTIR spektra modificovanih nosača od otpadne kafe sa FTIR spektrom nemodifikovane otpadne kafe, može se uočiti da je nosač od otpadne kafe-GlA pretrpeo zanemarljive promene površine (**slika 6.25**). Veće površinske varijacije su pronađene na otpadnoj kafi-H₂O₂, dok su najjači i intenzivniji signali primećeni na

otpadnoj kafi-ClO₂. Naročito povećanje se dogodilo u regionu 3200-3600 cm⁻¹, što ukazuje istežanje vibracija vodoničnih veza hidroksilnih grupa v (OH). Preciznije, izračunato je uvećanje površine signala od 1535 % za v (OH) na osnovu karbonilnih grupa. Nasuprot ovom uvećanju, umanjani su pikovi na 2887 cm⁻¹ i 2811 cm⁻¹, koji upućuju na C–H asimetrične i simetrične istegnute metilen i metil grupe [209]. Zabeležen je prepoznatljiv pik na 1640,7 cm⁻¹ na nemodifikovanoj otpadnoj kafi (koji se može pripisati C=O istežanju vibracija karboksilne (–COO–) grupe) koji se na modifikovanim nosačima smanjio ili čak izgubio [21]. Pojavio se i novi pik na 1552,7 cm⁻¹ na otpadnoj kafi-ClO₂ koji predstavlja istežanje vibracija amino grupa. Ovaj opseg istežanja vibracija amino grupe je superponiran u odnosu na vibracije istežanja hidroksilne grupe u regionu 3500-3200 cm⁻¹ [210]. Promene u karakterističnom region 900-1600 cm⁻¹ mogu se dodeliti C–C istežanju ili C–H deformaciji u ravni aromatičnog prstena [211]. Takođe, došlo je i do promena u region otisaka prsta.

6.4.1.1.2. Naelektrisanje površine

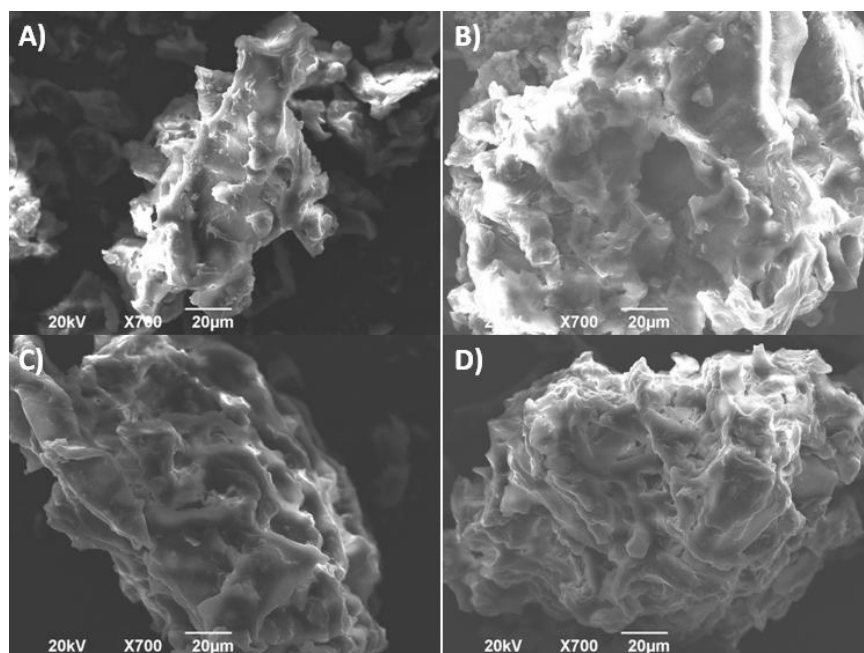
Na **slici 6.26.(a-d)** prikazano je određivanje tačke pH_{pzc} otpadne kafe i modifikovanih adsorbenata od otpadne kafe sa tri različita aktivatora (otpadna kafa-GIA, otpadna kafa-ClO₂, otpadna kafa-H₂O₂). Izmerene vrednosti tačke nultog naelektrisanja bile su: za otpadnu kafu 5,60, za otpadnu kafu-GIA 5,00, za otpadnu kafu-ClO₂ 2,25 i za otpadnu kafu-H₂O₂ 5,25. Dakle, u suspenzijama čija je pH sredine ispod tačke nultog naelektrisanja površina ovih adsorbenata biće pozitivno naelektrisana, i obrnuto, za pH sredine čije su vrednosti iznad ove tačke površina adsorbenata od kafe biće elektronegativna.



Slika 6.26. Određivanje tačke pH_{pzc} otpadne kafe (a), otpadna kafa-GIA (b), otpadna kafa- ClO_2 (c) i otpadna kafa- H_2O_2 (d).

6.4.1.1.3. Prikaz izgleda i strukture aktivne površine

Morfologija nosača od kafe prikazana je mikrografima skenirajućeg elektronskog mikroskopa na **slici 6.27.(A-D)**. Mikrografi su urađeni pri uvećanju od 700 puta sa kojih se može uočiti da su postupci modifikacije uticali na poroznost nosača od kafe. Najeksplicitnija poroznost materijala je dobijena korišćenjem ClO_2 (**slika 6.27.C**) i H_2O_2 (**slika 6.27.D**).

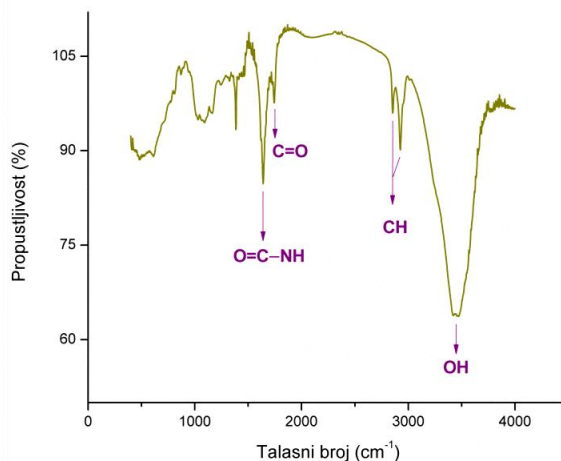


Slika 6.27. SEM mikrografi otpadne kafe (A), otpadna kafa-GIA (B), otpadna kafa-ClO₂ (C) i otpadna kafa-H₂O₂ (D)

Imajući u vidu poroznost nosača, treba napomenuti da veća distribucija pora ne garantuje nužno i veću efikasnost imobilizacije enzima. Procenjuje se da prisustvo mikropora na nosaču čini nosač manje dostupnim za molekule enzima. Oni ne mogu da prođu kroz mali dijametar pora ka njihovoj unutrašnjoj površini, već se njihova adsorpcija odigrava na spoljašnjoj površini. Očigledno je ClO₂ svojim delovanjem formirao dominantnu makroporoznu i mezoporoznu mrežu, čije su pore dovoljno velike za prolazak enzima celulaze u unutrašnju površinu nosača od kafe (**slika 6.27.C**). Na taj način je i zabeležen porast efikasnosti imobilizacije enzima u odnosu na ostale nosače od kafe. Pored toga, u šupljinama ovako poroznih materijala, omogućena je veća mobilnost i fleksibilnost enzima celulaze, čime se ispoljava i veća aktivnost enzima, što potvrđuju i ranija istraživanja iz ove oblasti [140, 141, 212]. U vezi sa tim, smatra se da ovako pripremljen nosač može da zadovolji potrebe procesa imobilizacije enzima komercijalne celulaze.

6.4.1.1.4. Potvrda imobilizacije komercijalne celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂

FTIR spektar otpadna kafa-ClO₂ nakon imobilizacije komercijalnog enzima celulaze prikazan je na **slici 6.28**.

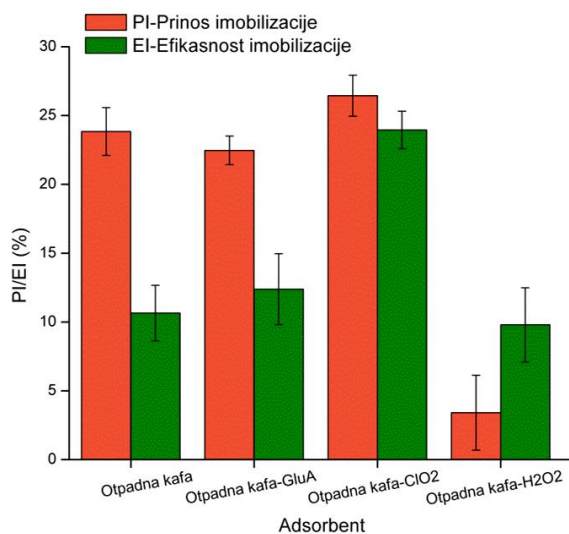


Slika 6.28. FTIR spektar otpadne kafe-ClO₂ nakon imobilizacije enzima

Nakon upoređivanja FTIR spektara otpadne kafe-ClO₂ pre i nakon imobilizacije enzima celulaze, uočeno je nekoliko razlika (**slike 6.25.A i slika 6.28**). Pikovi koji predstavljaju CH i C=O grupe su intenzivirani i širi kod FTIR spektra nosača nakon imobilizacije enzima. Najvažnija promena se dogodila u piku na 1639 cm⁻¹, koji opisuje amidnu grupu (O=C-NH) enzima celulaze. Ovaj pik je pomeren i intenziviran u odnosu na FTIR spektar otpadne kafe-ClO₂ [213]. Takođe, NH istezanje na oko 3471 cm⁻¹ je povezano sa prisustvom NH₂. Ovaj pik je u spektru nakon imobilizacije enzima pomeren na oko 3456 cm⁻¹ i intenziviran verovatno i zbog prisustva vode koja zaostaje u uzorku [21, 123].

6.4.1.2. Uticaj modifikacije nosača na imobilizaciju komercijalne celulaze

Aktivatori, glutraldehid, hlor-dioksid i vodonik-peroksid, koji su modifikovali otpadnu kafu, uticali su i na prinos i na efikasnost imobilizacije komercijalne celulaze (**slika 6.29**).



Slika 6.29. Prinos i efikasnost imobilizacije komercijalne celulaze na različitim adsorbentima

Na osnovu dobijenih rezultata za prinos imobilizacije enzima, otpadna kafa se pokazala kao veoma interesantan adsorbent. Svi korišćeni nosači, osim otpadne kafe- H_2O_2 , poseduju zadovoljavajući potencijal (preko 20 %) za imobilizaciju komercijalne celulaze (**slika 6.29.**). Očigledno je i da ispitani nosači imaju priličan broj dostupnih adsorpcionih mesta na svojoj površini, što potvrđuju i prethodno analizirane površine nosača. Prinos imobilizacije komercijalne celulaze na otpadnoj kafi- H_2O_2 bila je prilično niska i ako je specifična površina nosača bila velika. Prisustvo velikog broja mikroporoznih kanala, kao i odsustva odgovarajućih funkcionalnih grupa na površini nosača (**slika 6.27.D** i **slika 6.25.D**), učinila je ovaj nosač neprikladnim za imobilizaciju enzima. Suprotna pojava zabeležena je kod nosača otpadna kafa-GluA. Ovaj nosač poseduje manju poroznost materijala, ali je ipak ostvarena relativno dobra imobilizacija celulaza, što može biti povezano sa prisustvom odgovarajućih funkcionalnih grupa na površini nosača (**slika 6.27.B** i **slika 6.26.B**). Sa druge strane, vrednosti efikasnosti imobilizacije enzima na ova dva nosača, uključujući i otpadnu kafu, bile su niže. Na nosačima verovatno postoje neke hemijske grupe koje negativno utiču na imobilisane enzime da manifestuju svoju stvarnu aktivnost [214]. Interakcije sa određenim jedinjenjima mogu da utiču na savijanje ili stabilnost enzima, a mala šupljina pora na smanjenje njihove mobilnosti [215, 216].

Tejrijan i Ksu (*Tejiriain* i *Xu*) (2011) [216] su ukazali na mogućnost uticaja hemijskih jedinjenja na celulaznu aktivnost, između ostalih i fenolnih jedinjenja, koja su očigledno zaostala u malim količinama i na nosačima od otpadne kafe. Ali kako otpadnu kafu čini i bogati sadržaj minerala, posebno kalijuma, magnezijuma i kalcijuma, nesumnjivo su doprineli, sa druge strane, boljoj stabilnosti imobilisanih enzima [216].

Velika količina imobilisanog enzima utiče i na to da mnogi od njih mogu ostati inaktivirani usled njihove prenatrpanosti na nosaču, što se verovatno i dogodilo kod primene nosača otpadna kafa-GIA. Imobilisani molekuli celulaze su ometali jedni druge i uticali na smanjenje efikasnosti imobilizacije [217]. I pored toga što je glutraldehid jedan od najpopularnijih aktivatora za imobilizaciju enzima, on u ovom slučaju nije izabran kao odgovarajući aktivator u daljim istraživanjima, kao i zbog njegove ekotoksičnosti [218, 219].

Najbolja kombinacija oba posmatrana parametra, prinosa imobilizacije (%) i efikasnosti imobilizacije (%), postignuta je u slučaju imobilizacije celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂. Više od četvrtine enzima adsorbovano je iz polaznog rastvora, od kojih je oko četvrtina pokazala aktivnost. Smatra se da je hlór-dioksid sposoban da ukloni agente koji ometaju enzime da ispolje svoju aktivnost, kao i da na najbolji način morfološki izmene nosač sa bogatom makroporoznom i mezoporoznom mrežom (**slika 6.28.C**). Takođe, prednost upotrebe ovog aktivatora je i taj što je nastali nosač otpadna kafa-ClO₂ netoksičan i može se bezbedno primenjivati čak i u formuli stočne hrane [220].

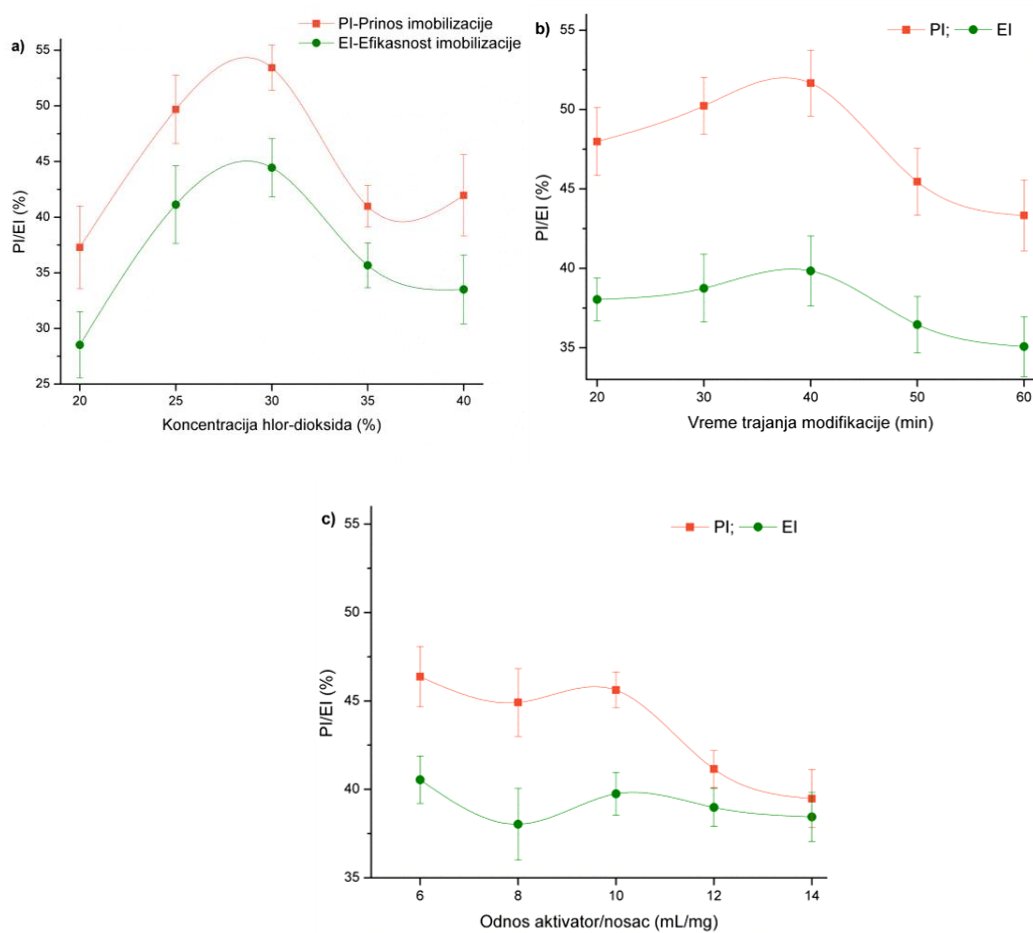
6.4.1.3. Uticaj procesnih parametara na modifikaciju adsorbenta (otpadna kafa-ClO₂)

Ispitani su uticaji procesnih promenljivih procesa modifikacije nosača: koncentracija aktivatora, vreme trajanja procesa modifikacije i odnos aktivator/nosač, kako bi se dobio najpogodniji nosač od otpadne kafe-ClO₂ za imobilizaciju komercijalnog enzima celulaze (**slika 6.30.(a-c)**). Vrednosti ispitanih pojedinačnih faktora su prikazani u **tabeli 6.26.**, a uspeh imobilizacije je praćen preko ranije pomenutih parametara, prinos i efikasnost imobilizacije (%).

Table 6.26. Procesne promenljive u procesu modifikacije otpadne kafe-ClO₂

Procesne promenljive	Primenjene vrednosti				
Koncentracija aktivatora (%)	20	25*	30	35	40
Vreme trajanja modifikacije (min)	20*	30	40	50	60
Odnos aktivator/nosač (ml/mg)	6*	8	10	12	14

*:konstantna vrednost procesne promenljive pri ispitivanju uticaja drugih faktora.



Slika 6.30. Uticaj koncentracije ClO₂ (a), vremena trajanja modifikacije (b) i odnosa aktivator/nosač (c) na efikasnost imobilizacije komercijalne celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂

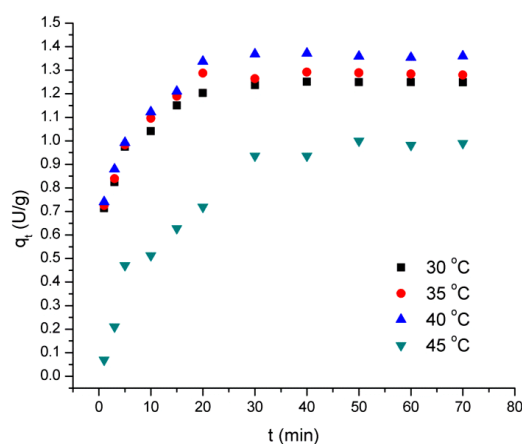
Uticaj koncentracije aktivatora (hlor-dioksida) na uspeh imobilizacije enzima na nosaču od otpadne kafe je predstavljena na **slici 6.30.a**. Sa povećanjem koncentracije hlor-dioksida do 30 %, raste i prinos i efikasnost imobilizacije komercijalne celulaze na nosaču. Nakon ove vrednosti, primećeno je da vrednosti ovih parametara imobilizacije opadaju. Aktivator je do ove tačke uspešno oksidirao čestice nosača, ali je potom negativno uticao na imobilizaciju enzima i nije doprineo visokoj enzimskoj aktivnosti. Modifikacija nosača sa najvećom koncentracijom hlor-dioksida doprinela je vizuelnoj promeni strukture nosača. Materijal je postao poprilično slepljen, a ne rastresit kao na početku modifikacije. Verovatno je ova promena teksture doprinela manjem uspehu prinosa i efikasnosti imobilizacije, zbog smanjenja dostupnih imobilizacionih mesta za molekule celulaze. Sa druge strane, postoji još jedna mogućnost za takvo smanjenje efikasnosti procesa, koju su opisali Ferreira (*Ferreira*) i saradnici (2003) [217] gde dolazi do unakrsnog povezivanja imobilisanih proteaza na silika derivatima.

Prinos imobilizacije je manje ili više opadao sa porastom odnosa aktivator/nosač, dok se efikasnost imobilizacije neznatno menjala u opsegu od 41 % do 38 % (**slika 6.30.c**). Može se primetiti da odnos aktivator/nosač između 6 ml/mg i 10 ml/mg nije imao neki značajan uticaj na uspeh modifikacije. Međutim, u skladu sa ekološkom svesću, održivim razvojem i ekonomičnošću, primena otpadne kafe, kao osnovnog materijala za dobijanje potencijalnog nosača za enzime celulaze, favorizuje primenu manje količine i nosača i aktivatora.

Sa porastom vremena trajanja modifikacije otpadne kafe do 40 minuta, rastu i prinos i efikasnost imobilizacije komercijalnog enzima. Nakon toga, dobijene vrednosti oba ispitivana parametra su bile nešto smanjene (**slici 6.30.b**). Tačnije, može se primetiti da je prinos imobilizacije uvek bio veći, a da je efikasnost procesa uvek bila niža u svim ispitanim vremenima trajanja modifikacije. Verovatno je usled interakcije među imobilisanim celulazama ispoljena i manja aktivnost [217]. Takođe, sa dužim trajanjem procesa modifikacije zapažena je i veća promena teksture nosača. Ipak, najbolji rezultati su postignuti sa trajanjem procesa modifikacije od 30 minuta, primenom 25 % rastvora hlor-dioksida i odnosa aktivator/nosač od 6 ml/mg.

6.4.1.4. Tok reakcije i postizanje ravnoteže

Tok procesa imobilizacije komercijalnog enzima celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂, posmatran je preko promene kapaciteta adsorpcije (q_t , U/g) enzima na nosaču u zavisnosti od temperature (30-45°C) i vremena trajanja procesa. Rezultati su prikazani grafički na slici 6.31.



Slika 6.31. Uticaj vremena adsorpcije celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂ (masa adsorbenta: 5 g/l, koncentracija celulaze: 3 g/l, 150 rpm)

Posmatrajući **sliku 6.31.** može se uočiti da temperatura utiče na količinu adsorbovane celulaze po jedinici mase otpadne kafe-ClO₂. Sa porastom temperature do 40 °C rastu i adsorpcioni kapaciteti, dok na temperaturi od 45 °C dolazi do drastičnog smanjenja adsorpcionih kapaciteta. Sa druge strane, visina temperature ne utiče na postizanje ravnoteže. Dakle, tokom trajanja procesa adsorpcije enzima, mogu se uočiti dve faze, brza i sporija. Na početku procesa imobilizacije celulaze, na aktivnoj površini nosača nalazi se veliki broj dostupnih mesta, čiji se broj postepeno smanjuje kako proces odmiče. Ova brza ili eksponencijalna faza traje do oko 40-tog minuta, kada započinje druga, sporija faza imobilizacije. Tokom eksponencijalne faze, molekuli enzima se pasivno vezuju za nosač, a količina adsorbovanog enzima raste do kraja trajanja faze. Nakon ove tačke (40 minuta), količina enzima koja se adsorbuje na otpadnoj kafi-ClO₂ bila je u stanju dinamičke ravnoteže sa količinom enzima koja se desorbuje sa površine nosača [221]. Količina

celulaze adsorbovane u ravnotežnom vremenu ogleda se u maksimalnom adsorpcionom kapacitetu enzima na nosaču od kafe u okviru ocenjenih eksperimentalnih uslova [221]. Prema dobijenim rezultatima, uočeno je da se pri temperaturi od 40 °C postiže najveći adsorpcioni kapacitet. Dakle, ova temperatura je izabrana za dalje eksperimente adsorpcije enzima celulaze.

6.4.1.5. Adsorpciona kinetika i mehanizam procesa adsorpcije celulaze

Kinetika adsorpcije enzima celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂ analizirana je korišćenjem modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog modela međučestične difuzije.

Kinetički parametri adsorpcije komercijalnog enzima celulaze na različitim temperaturama, izračunati su iz vrednosti nagiba i odsečaka linearizovanih oblika kinetičkih modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda i prikazani su u **tabeli 6.27**.

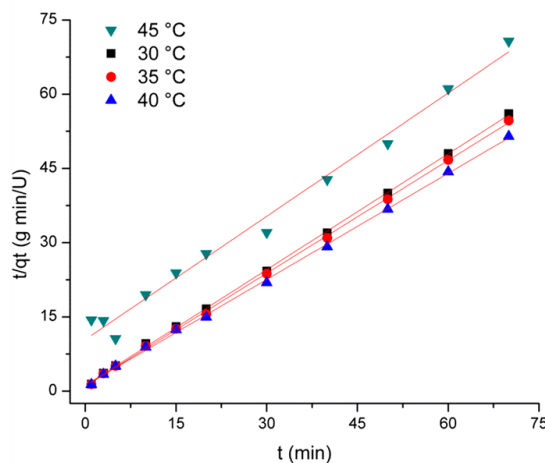
Tabela 6.27. Kinetički parametri adsorpcije celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂

Temperatura (°C)	q _{e,eks} [*] (U/g)	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		k ₁ (1/min)	q _{e,mod} ^{**} (U/g)	R ²	k ₂ (g/U min)	q _{e,mod} ^{**} (U/g)	R ²
30	1,249	0,105	0,361	0,709	0,536	1,281	0,999
35	1,290	0,075	0,206	0,360	0,582	1,314	0,999
40	1,359	0,072	0,259	0,329	0,453	1,399	0,999
45	0,990	0,094	0,970	0,476	0,066	1,204	0,986

*: q_e, eksperimentalno

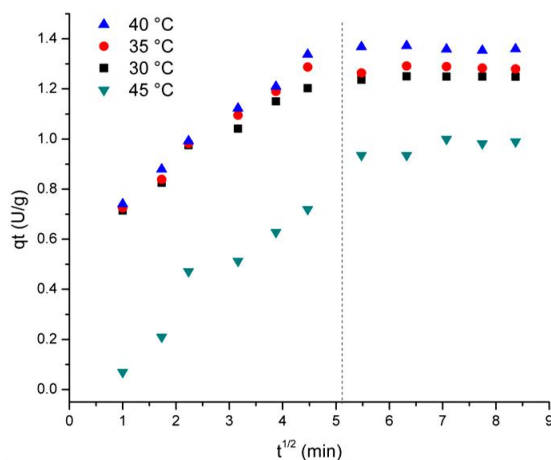
** : q_e, modelovano

Validnost kinetičkih modela se zasniva na vrednostima regresionih koeficijenta i slaganja između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti adsorpcionih kapaciteta. Imajući u vidu ove parametre, pronađeno je da imobilizacija celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂ prati kinetički model pseudo-drugog reda (**slika 6.32.**). Na osnovu principa ovog kinetičkog modela, ograničavajući korak procesa imobilizacije može biti hemijska adsorpcija. Daud (*Daoud*) i saradnici (2010) [121] su takođe otkrili da je kinetički model pseudo-drugog reda poslužio da opiše adsorpciono ponašanje celulaze i *Aspergillus niger* na komercijalnom aktivnom uglju.



Slika 6.32. Kinetika adsorpcije celulaze na otpadnoj kafi-CIO₂ po modelu pseudo-drugog reda

Grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ (slika 6.33.) je linearan i nagibi kriva ne prolaze kroz koordinatni početak, što sugerise da međučestična difuzija nije jedini kontrolišući korak u procesu imobilizacije celulaze na otpadnoj kafi-CIO₂ [2]. Konstante međučestične difuzije i efekti graničnog sloja pri različitim temperaturama su izračunate iz nagiba i odsečka krive zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ i prikazane su u tabeli 6.28.



Slika 6.33. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije celulaze na otpadnoj kafi-CIO₂

Može se primetiti da je proces adsorpcije celulaze na otpadnoj kafi-CIO₂ multilinearan proces koji se odigrava u dve faze. U prvom, oštrijem delu grafika, dolazi do difuzije enzima kroz vodeni rastvor do spoljašnje površine nosača i spontane adsorpcije

enzima i postepenog formiranja sloja. Druga faza je sporija i traje sve do kraja reakcije u kojoj dolazi do ravnoteže procesa adsorpcije i u kojoj usporava međučestična difuzija zbog niske preostale koncentracije enzima u rastvoru.

Tabela 6.28. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂

Temperatura (°C)	k_{ID1} U/g·h ^{1/2}	C ₁	R ₁ ²	k_{ID2} U/g·h ^{1/2}	C ₂	R ₂ ²
30	0,140	0,600	0,962	0,005	1,214	0,537
35	0,160	0,581	0,985	0,010	1,217	0,534
40	0,166	0,593	0,991	-0,005	1,397	0,413
45	0,181	-0,063	0,913	0,022	0,816	0,537

Sa porastom temperature procesa adsorpcije enzima do 40 °C, vrednosti mehaničkih konstanti u principu rastu i većina je pozitivna, što ukazuje da se adsorpcija na otpadnoj kafi-ClO₂ odigrala u relativno kratkom vremenskom periodu. Vrednost k_{ID2} (40 °C) je bila jako niska, što ukazuje da ukoliko je došlo do reverzne difuzije, ova desorpcija se može smatrati beznačajnom [165].

6.4.2. Adsorpcija celulaze sintetisane pomoću soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1

6.4.2.1. Uticaj procesnih parametara na imobilizaciju celulaze iz CKS1

Ispitani su uticaji procesnih parametara, količine adsorbenta, pH, temperature, vremena trajanja procesa i dodatak metalnih jona na imobilizaciju celulaze proizvedene iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ (slika 6.34.(a-c)). Vrednosti ispitanih pojedinačnih faktora su prikazane u tabeli 6.29., a efikasnost imobilizacije je praćena preko prinosa i efikasnosti imobilizacije (%).

Tabela 6.29. Procesne promenljive u procesu imobilizacije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂.

Procesne promenljive	Primenjene vrednosti						
Masa nosača (g/l)	8	12*	16	20			
pH	3	4	5	6	7*	8	9
Koncentracija jona metala (mmol)	0*	5	10	15	20		
Vreme trajanja procesa (min)	5	10	15	30*	45	60	90
Temperatura (°C)	27*	40	45	50			

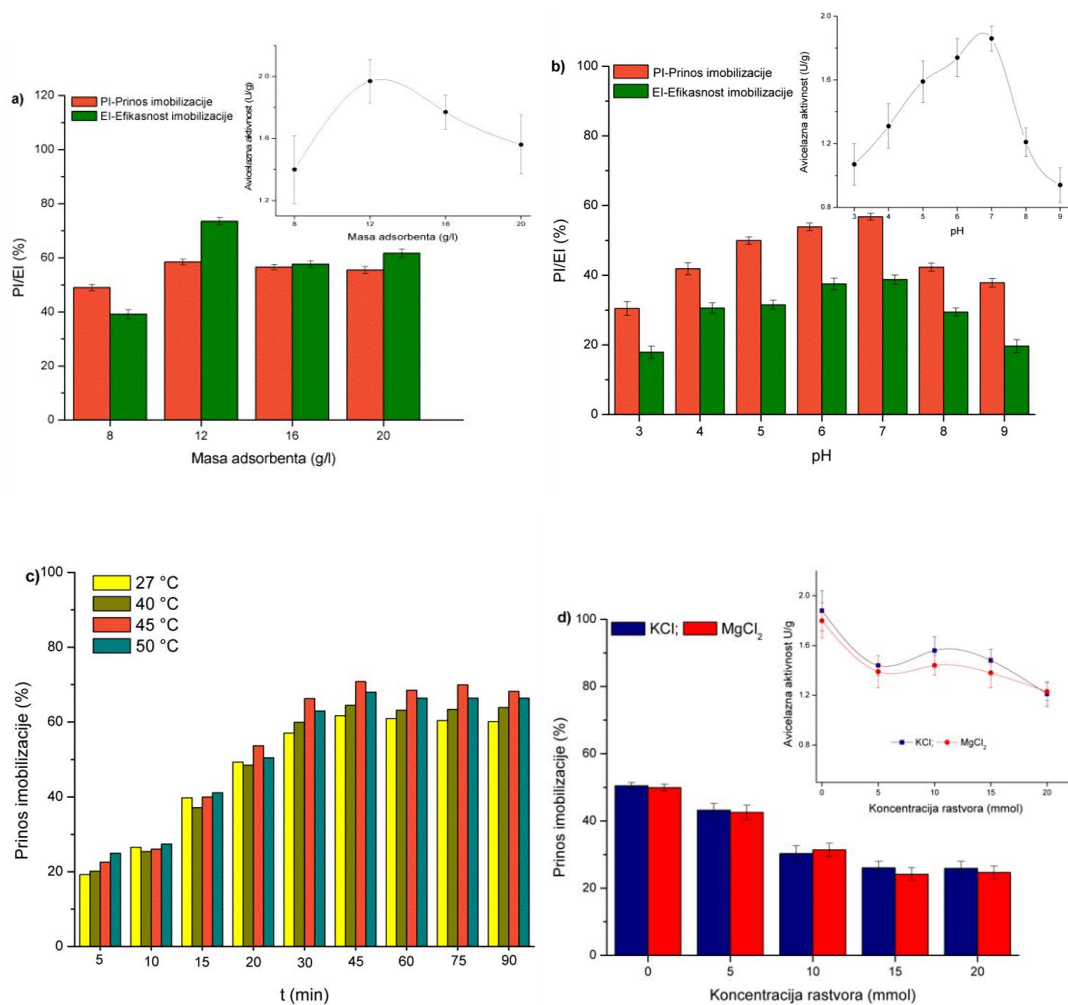
*: konstantna vrednost procesne promenljive pri ispitivanju uticaja drugih efekata.

Uticaj mase otpadne kafe-ClO₂ na efikasnost imobilizacije celulaze iz CKS1 je predstavljena na **slici 6.34.a**. Prinos imobilizacije se kretao od oko 49 % do 62 %. Porast mase nosača do 12 g/l je uticao na poboljšanje prinosa imobilizacije davanjem veće površine i dostupnosti većeg broja vezivnih mesta za enzim. Dalje povećanje količine nosača u sistemu imalo je za rezultat smanjenje uspeha imobilizacije enzima. Postoji mogućnost da je došlo do formiranja sloja čestica kafe (taloženje ili slepljivanje usled velike količine nosača), čak i kada se radi o reaktorima u čijem sistemu je zastupljeno potpuno mešanje, što je indukovalo smanjenju efektivne površine. Posledica ove pojave je smanjenje procenta imobilizacije celulaze po jedinici mase nosača. Pored toga, spekuliše se i da poroznost materijala kafe utiče na neuniformno vezivanje enzima na njoj.

Takođe, pri najboljim uslovima količine nosača (12 g/l) postignuta je i maksimalna egzoglukanazna aktivnost imobilisanog enzima od 1,97 U/g na otpadnoj kafi-ClO₂ nosaču (**slici 6.34.a**). Dobijene vrednosti za prinos imobilizacije su sasvim zadovoljavajuće u odnosu na izveštaje pronađene u literaturi. Ju (*Yu*) i saradnici (2013) su primetili da je uspeh imobilizacije celulaze na rastvorljivo-nerastvorljivom reverzibilnom polimeru Eudragit S-100 bio oko 40 % [222]. Osim toga, 50 %-tnu efikasnost imobilizacije komercijalne celulaze na čvrstoj biomasi postigli su Kumar i Wiman (*Kumar i Wyman*) (2008) [223].

Što se tiče efikasnosti imobilizacije celulaze na nosaču, vrednosti su nepravilno varirale u ispitanom opsegu korišćene mase nosača otpadne kafe-ClO₂ i kretale su se od

oko 39 % do oko 73 %. Međutim, ipak se maksimalna efikasnost imobilizacije enzima poklopila sa maksimalnim prinosom imobilizacije kod primene mase nosača od 12 g/l.



Slika 6.34. Uticaj mase adsorbenta (a), pH (b), temperature i vremena trajanja procesa (c) i koncentracija jona metala (d) na imobilizaciju celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂

Imajući u vidu da je enzimska aktivnost zavisna od jonizacionog stanja aktivnog mesta aminokiselina, ispraćen je uticaj pH rastvora enzima na proces imobilizacije celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂ u opsegu od 3 do 9 (slika 6.34.b). Primećeno je da su i prinos i efikasnost imobilizacije postigli najviše vrednosti kod primene pH u opsegu od 5 do 7. Međutim, aktivnost imobilisane celulaze iz CKS1 je bila nešto niža kada se imobilizacija

odigravala pri pH 5, dok je maksimalna vrednost enzimske aktivnosti postignuta na pH blizu 7 (**slika 6.34.b**). Na krajnjim tačkama, pH 3 i pH 9, prinos i efikasnost imobilizacije je drastično smanjen, zajedno sa aktivnošću imobilisanog enzima. Jiankin Zou (*Jianqin Zhou*) je primetio da je pH 5 optimalna pH za imobilizaciju celulaze iz *Trichoderma viride* na hitozanu [224]. U svakom slučaju, treba uzeti u obzir i rezultate procesa imobilizacije proizvedene celulaze iz CKS1 bez podešavanja pH rastvora. Polazna vrednost pH rastvora celulaze nakon proizvodnje enzima je 7,21 i gotovo je ostala nepromenjena nakon završetka imobilizacije. Osim toga, izostanak podešavanja pH rastvora je rezultirao u održavanju pravilne konformacije imobilisane celulaze, a ostvarena avicelazna aktivnost je 1,86 U/g. Stoga se može smatrati da nema potrebe za modifikacijom pH vrednosti polaznog rastvora proizvedenih enzima kako bi se postigla uspešna imobilizacija celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂.

Uticaj trajanja procesa imobilizacije celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂ je praćen u zavisnosti od temerature procesa (**slika 6.34.c**). U ovom slučaju samo je posmatran prinos imobilizacije. Sa porastom vremena trajanja procesa do 45 minuta raste i prinos imobilizacije od oko 19 % do oko 71 %. Na preostalim vremenskim intervalima od 60 do 90 minuta prinos imobilizacije je bio nešto niži. Najviši prinos imobilizacije je postignut pri temperaturi procesa od 45 °C na celom ispitanom opsegu vremena trajanja procesa imobilizacije enzima na otpadnoj kafi-ClO₂. Povećanje prinosa do 45-og minuta bilo je u proseku oko 3 puta. Na primer, i Elv (*Lv*) i saradnici (2013) su primetili da je količina adsorbovanog enzima amilaze na nosaču poreklom od stabljike kukuruza, takođe zavisna od temperature sa maksimalnim uspehom na 36 °C [221]. Nasuprot ovome, Prieto (*Prieto*) i saradnici (2014) su pronašli da količina adsorbovanog enzima β -galaktozidaze na jedinici mase komercijalnog aktivnog uglja opada sa porastom temperature od 25 °C do 50 °C [225]. Ovi istraživači su istakli da je negativan uticaj povišene temperature na adsorpciju enzima mogao biti zbog promene konformacije adsorbovanih enzima na aktivnim mestima nosača. Takođe, povećanje temperature povećava i kinetičku energiju enzima. Najviša vrednost aktivnosti imobilisane celulaze na otpadnoj kafi-ClO₂ bila je na 45 °C i iznosila je 2,67 U/g. Na ostalim ispitanim temperaturama, egzoglukanazna aktivnost imobilisanog enzima je opadala sa smanjenjem temperature od 50 °C do 27 °C. Da bi dobijeni rezultati bili

jasniji, utvrđeno je da je slobodna celulaza pokazala višu egoglukanaznu aktivnost na 50 °C nego na 40 °C. Dakle, može se zaključiti da celulaza proizvedena bakterijskom kulturom CKS1, toleriše više temperature reakcije.

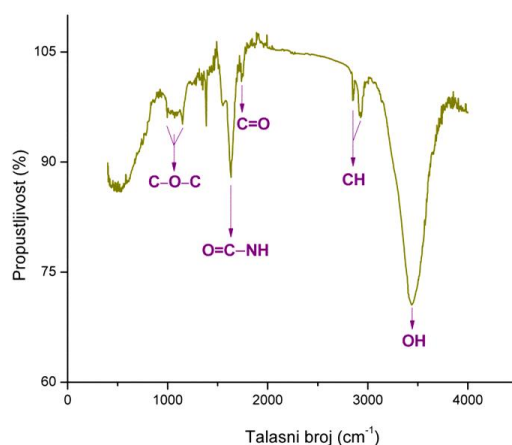
Uticaj dodatka jona metala kalijuma (K^+) i magnezijuma (Mg^+) u radni rastvor celulaze iz CKS1 na njihovu imobilizaciju na otpadnoj kafi je prikazan na **slici 6.34.d**. Sa porastom koncentracije KCl i $MgCl_2$ u radnom rastvoru do 15 mmol, prinos imobilizacije celulaze na otpadnoj kafi- ClO_2 je opadao, nakon čega je ostao nepromenjen. Mogući razlog ovakvog ponašanja može biti fenomen zasićenja površine nosača, gde se joni metala takmiče sa molekulima celulaze za aktivna mestima na površini otpadnoj kafi- ClO_2 . Pored toga, prisustvo soli može da prouzrokuje promenu konformacije enzima, što rezultira smanjenjem hidrofobnih interakcija između površine enzima i nosača [226, 227]. Nasuprot tome, primećeno je povećanje egzoglukanazne aktivnosti imobilisanog enzima. U vezi s tim, dalje je razmotren uticaj jona kalijuma i magnezijuma na aktivnost slobodnog i imobilisanog enzima.

30 μ L rastvora soli koncentracije od 5 mmol do 20 mmol je dodavano u reakcionu smešu za određivanje egzoglukanazne aktivnosti slobodnog i imobilisanog enzima. Relativna aktivnost slobodne i imobilisane celulaze je izračunata korišćenjem enzimske aktivnosti pre i nakon dodavanja soli u reakcionu smešu (**slika 6.34.d**).

Relativna egzoglukanazna aktivnost imobilisane celulaze raste do 25 % sa dodatkom 10 mmol rastvora soli. Preciznije, slobodni enzim je pokazao nešto veću aktivnost dodatkom $MgCl_2$ nego KCl, dok je kod imobilisane celulaze KCl imao značajniji uticaj na povećanje aktivnosti. Smatra se da ovakav pozitivan efekat kalijuma i magnezijuma na celulaznu aktivnost poboljšava funkcionalne osobine imobilisanih enzima. Osim toga, treba imati na umu da kafa takođe poseduje kalijum, magnezijum i kalcijum u određenim količinama [228], tako da je verovatno doprinela delimičnoj stabilizaciji enzima.

6.4.2.2. Potvrda imobilizacije celulaze iz CKS1 na otpadnoj kafi-CIO₂

FTIR spektar otpadne kafe-CIO₂ nakon imobilizacije celulaze iz CKS1 prikazan je na slici 6.35.

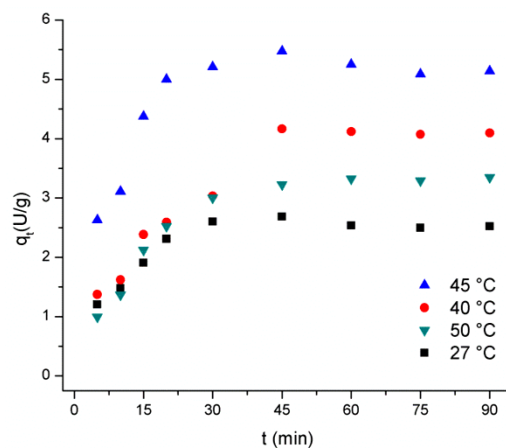


Slika 6.35. FTIR spektar otpadne kafe-CIO₂ nakon imobilizacije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1

Upoređivanjem FTIR spektara otpadne kafe-CIO₂ pre i nakon imobilizacije proizvedenog enzima celulaze, uočeno je nekoliko razlika (slike 6.25.A i 6.35.). Najznačajnija promena na FTIR spektru imobilisane celulaze se dogodila u region 1540-1650 cm⁻¹, koji je specifičan za molekule proteina [123]. Karakterističan pik za NH₂ grupu je zabeležen na oko 1633 cm⁻¹. Takođe, NH₂ grupa može biti povezana i sa NH istezanjem na oko 3437 cm⁻¹ [21, 123]. Istezanje blizu 1551 cm⁻¹ sugeriše prisustvo karboksilne grupe enzima [229]. Što se tiče drugih promena na FTIR spektru imobilisanog enzima na nosaču od otpadne kafe, zabeležene su manje izražene promene blagim intenziviranjem signala na oko 1147 cm⁻¹ i na 995 cm⁻¹ koji predstavljaju istezanje vibracije $\nu(\text{CO})$ C–O–C glikozidnog mosta. Ovi absorpcioni pikovi mogu biti povezani sa celobiozom, što ukazuje na njeno prisustvo u tragovima u supernatantu nakon proizvodnje enzima [230].

6.4.2.3. Tok reakcije i postizanje ravnoteže

Tok procesa imobilizacije celulaze iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂, posmatran je preko promene kapaciteta adsorpcije (q_t , U/g) enzima na nosaču u zavisnosti od temperature (27-50°C) i vremena trajanja procesa (slici 6.36.).



Slika 6.36. Uticaj vremena adsorpcije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ (masa adsorbenta: 5 g/l, 150 rpm)

Na početku procesa imobilizacije enzima, do 45-tog minuta dolazi do relativno brze eksponencijalne faze, što ukazuje na pasivno vezivanje celulaze na površini otpadne kafe-ClO₂. Takođe, na početku procesa dostupan je i veliki broj dostupnih slobodnih mesta na nosaču. Nakon ove faze usledila je druga faza u kojoj dolazi do ostvarivanja termodinamičke ravnoteže. U ovoj fazi se smatra da nema promene između količine adsorbovanog enzima i količine desorbovanog enzima sa nosača. Takođe, primećeno je da temperatura utiče na količinu adsorbovanog enzima i opada sa opadanjem temperature od 45 °C do 27 °C. Odstupanja koja su se dogodila na temperaturi od 50 °C, verovatno su vezana za posledicu mogućih konformacionih promena enzima. Ustanovljeno je da celulaza iz CKS1 toleriše nešto višu temperaturu (45 °C) imobilizacije, za razliku od 40 °C na kojoj je postignut najviši kapacitet imobilizacije komercijalne celulaze.

6.4.2.4. Adsorpciona kinetika i mehanizam procesa adsorpcije celulaze iz CKS1

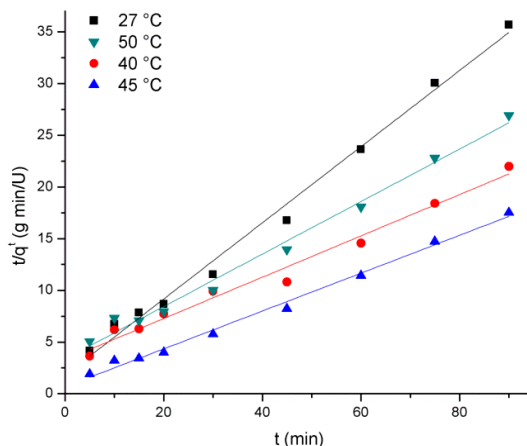
Kinetika adsorpcije enzima celulaze iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ analizirana je na identičan način kao u slučaju adsorpcije komercijalne celulaze. Kinetički parametri adsorpcije enzima na različitim temperaturama, izračunati su iz vrednosti nagiba i odsečaka linearizovanih oblika kinetičkih modela i prikazani su u tabeli 6.30.

Tabela 6.30. Kinetički parametri adsorpcije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ (masa adsorbenta 20 g/l, 150 rpm)

Temperatura (°C)	q _{e,eks} * (U/g)	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		k ₁ (1/min)	q _{e,mod} ** (U/g)	R ²	k ₂ (g/U min)	q _{e,mod} (U/g)	R ²
27	2,850	0,006	0,779	0,065	0,058	2,779	0,974
40	3,325	0,067	1,502	0,468	0,019	3,940	0,983
45	5,481	0,012	1,048	0,078	0,012	5,579	0,987
50	4,173	0,023	3,174	0,943	0,015	5,012	0,988

*: q_e, eksperimentalno;

** : q_e, modelovano.

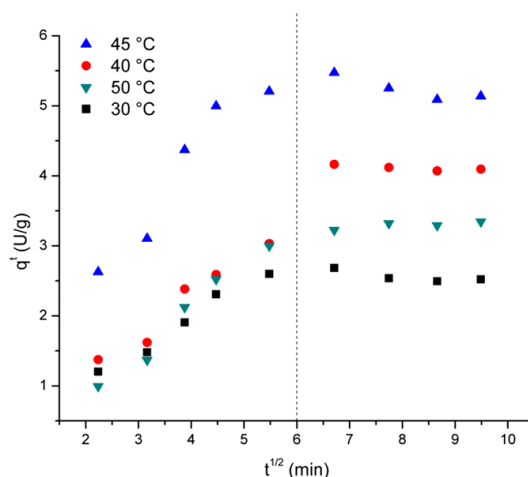


Slika 6.37. Kinetika adsorpcije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ po modelu pseudo-drugog reda

Na osnovu koeficijenta korelacije i predviđenih vrednosti adsorpcionih kapaciteta, proces imobilizacije celulaze iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ prati kinetički model pseudo-

drugog reda. Vrednosti koeficijenta korelacije bile su dovoljno visoke, 0,974-0,988, čime se ovim modelom ovaj proces imobilizacije aproksimiše. Uz to se i vrednosti predviđene modelom za adsorpcioni kapacitet dobro slažu sa dobijenim eksperimentalnim vrednostima. Kinetička konstanta (k_2) je opadala sa porastom temperature do 45 °C, čime se predviđa povećanje stope adsorpcije celulaze na višim temperaturama, dok je na najvišoj testiranoj temperaturi (50 °C), došlo do smanjenja. Du (Du) i saradnici (2012) su na sličan način utvrdili da stopa imobilizacije celulaze na nosaču od klipa kukuruza raste sa porastom temperature od 4 °C do 50 °C [231]. Dakle, na niskim temperaturama (naročito na 4 °C) se smanjuje sposobnost kretanja celulaze duž reakcionog medijuma čime se smanjuje i stopa imobilizacije enzima. U skladu sa principima kinetičkog modela pseudo-drugog reda, ograničavajući korak procesa imobilizacije može biti hemijska adsorpcija. U literature se mogu naći izveštaji koji su suprotni sa ovim dobijenim u radu. Na primer, imobilizacija celulaze iz *Aspergillus niger* na komercijalnom aktivnom uglju prati kinetički model pseudo-drugog reda [121], dok se kinetika imobilizacije celulaze na nosaču od lignoceluloze odlikuje kinetičkim modelom pseudo-prvog reda [231].

Na osnovu Veber-Morisovog modela međučestične difuzije dobija se grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ (slika 6.38.) koji je linearan i nagibi kriva ne prolaze kroz koordinatni početak, što sugeriše da međučestična difuzija nije jedini kontrolišući korak u procesu imobilizacije celulaze na otpadnoj kafi- ClO_2 [2]. Konstante međučestične difuzije i efekti graničnog sloja pri različitim temperaturama su izračunate iz nagiba i odsečka krive zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ (tabeli 6.31.).



Slika 6.38. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂

Proces adsorpcije celulaze iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ je multiliniarni proces koji se odigrava u dve faze, na isti način kao i adsorpcija komercijalne celulaze.

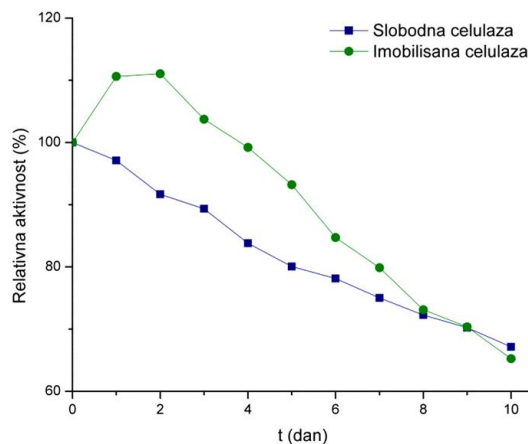
Tabela 6.31. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂

Temperatura (°C)	k_{ID1} U/g·h ^{1/2}	C ₁	R ₁ ²	k_{ID2} U/g·h ^{1/2}	C ₂	R ₂ ²
30	0,460	0,133	0,970	-0,041	2,931	0,833
40	0,546	0,102	0,944	0,060	3,551	0,995
45	0,887	0,652	0,888	0,038	4,966	0,850
50	0,657	-0,525	0,968	0,036	3,004	0,548

Sa porastom temperature procesa adsorpcije enzima celulaze iz CKS1 do 45 °C, mehaničke konstante su pozitivne i rastu, što ukazuje da se adsorpcija na otpadnoj kafi-ClO₂ odigrala u relativno kratkom vremenskom periodu. Negativni predznak k_{ID2} ukazuje na mogućnost da je došlo do reverzne difuzije enzima [165]. S obzirom da je vrednost konstante relativno mala, ova desorpcija se ne može smatrati značajnom.

6.4.2.5. Stabilnost imobilisane celulaze

Stabilnost imobilisanog enzima je od velikog značaja za njegovu dalju primenu. Stabilnost slobodnog i imobilisanog enzima je praćena u periodu od 10 dana, a uzorci su čuvani na 4 °C. Rezultati stabilnosti uzoraka enzima su prikazani na **slici 6.39.**, a relativna aktivnost je određena u funkciji vremena.



Slika 6.39. Stabilnost slobodnog i imobilisanog enzima celulaze iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 u periodu od 10 dana

Primećeno je da su i slobodni i imobilisani enzim izgubili oko 33 % od svoje početne aktivnosti nakon 9 dana. U prvih četiri dana, aktivnost imobilisane celulaze je porasla, a potom je progresivno opadala. Porast enzimske aktivnosti je verovatno posledica konformacione stabilnosti molekula celulaze nakon vezivanja sa površinom nosača. Pored toga, magnezijum i kalijum, koji su prisutni u strukturi nosača od kafe, verovatno su doprineli da se unapredi stabilnost enzima. Treba uzeti u obzir da su ova ispitivanja vršena u vlažnim uslovima. Dehidratacija nosača sa enzimom mogla bi doprineti daljoj stabilizaciji. U svakom slučaju, imobilisana celulaza iz CKS1 na otpadnoj kafi-ClO₂ je pokazala bolje osobine skladištenja na 4 °C u periodu od 9 dana u poređenju sa slobodnim sirovim enzimom.

7. ZAKLJUČAK

Predmet ove doktorske disertacije je valorizacija repinih rezanaca, nus-proizvoda agroindustrije i otpadne kafe zaostale nakon pripreme napitka.

U prvom delu ispitane su karakteristike pripremljenh adsorbenata od repinih rezanaca i razmatran je predlog njihove primene za potrebe adsorpcije boje iz kontaminiranih otpadnih voda. Upoređena je njihova efikasnost sa adsorbentom neorganskog porekla, prirodnim zeolitom, za istu svrhu.

Za potrebe kompletne obrade otpadne vode nakon adsorpcije boje, u drugom delu je uključen još jedan postupak obrade, proces biorazgradnje pomoću vrsta iz roda *Streptomyces*.

U trećem delu određene su karakteristike modifikovane otpadne kafe i razmatrana je njihova primena kao nosača za imobilizaciju enzima celulaza (komercijalno dostupnu iz *Trichoderma reesei* i celulaza iz prirodnog izolata *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1).

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- FTIR analizom neaktiviranih i aktiviranih adsorbenata, repinih rezanaca i zeolita, dokazano je prisustvo funkcionalnih grupa koje su tipične za aktivne ugljeve. Poređenjem spektara snimljenih pre i posle adsorpcije boje kristal violet, primećeno je da se većina pikova, koji potiču od istih funkcionalnih grupa u poređenim spektrima, javljaju na sličnim talasnim brojevima, uz manja ili veća pomeranja ili promene intenziteta. Adsorpcija adsorbata se odvijala pretežno posredstvom van der Valsovih, vodoničnih, hidrofobnih i/ili elektrostatičkih interakcija.
- Vrednost pH_{pzc} tačke neaktiviranih repinih rezanaca iznosi 3,25, dok je vrednost za aktivirane repine rezance nešto viša i iznosi 3,9. Kod neaktiviranog zeolita, vrednost pH_{pzc} tačke iznosi 6, dok je vrednost za aktivirani zeolit bila oko 6,25. U vezi s tim, površina adsorbenata bila je pozitivno naelektrisana u sredinama čija je pH ispod ovih vrednosti.

- Uspostavljanje ravnotežnog stanja adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane repine rezance, trajalo je dva puta duže u poređenju sa primenom aktiviranih repinih rezanca, kod kojih se ravnoteža uspostavila nakon 45 minuta. Daleko uspješniji su bili neaktivirani i aktivirani zeolit. Uspostavljanje ravnotežnog stanja odigralo se u toku prvih 10 minuta, odnosno prvih 5 minuta.
- Kinetika adsorpcije boje, na svim korišćenim adsorbentima, je najbolje opisana modelom pseudo-drugog reda, na celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija.
- Analizom adsorpcione ravnoteže primenom neaktiviranih i aktiviranih repinih rezanaca pronađeno je da je adsorpcija boje aproksimirana teorijskim modelom Tempkinove izoterme, dok je, kod primene adsorbenata od zeolita, opisana Frojndlihovom izotermom.
- Pod optimizovanim uslovima, maksimalni adsorpcioni kapacitet boje kristal violet na aktivirane repine rezance bio je 28,863 mg/g, dok je kod aktiviranog zeolita 34,085 mg/g.
- Maksimalna količina uklonjene boje iz vodenog rastvora u sistemu sa aktiviranim adsorbentima, pod optimizovanim uslovima, iznosila je 84,597 % za repine rezance i 99,619 % za zeolit.
- Kvalitativne enzimske analize za *Streptomyces microflavus* CKS6 i *Streptomyces fulvissimus* CKS7, pokazale su bogat enzimski profil ovih sojeva.
- *Streptomyces microflavus* CKS6 je bila uspješnija u biorazgradnji boje kristal violet jer joj je za obezbojavanje rastvora koncentracije boje od 0,005 g/l bilo potrebno 5 sati, dok je pak pet puta više vremena bilo potrebno vrsti *Streptomyces fulvissimus* CKS7.
- Najpovoljniji operativni uslovi za biorazgradnju su bili jednaki kod primene obe vrste: temperatura 30 °C, 120 rpm, veličina inokuluma 10 %, pH 6.
- *Streptomyces microflavus* CKS6 je uspješno razgradila boju kristal violet adsorbovanu na aktivirane repine rezance, kao i u realnom sistemu, otpadnoj

vodi zaostaloj nakon bojenja preparata za mikroskopsko posmatranje bakterija.

- Analiza fitotoksičnosti medijuma obezbojenih bakterijskim kulturama pokazala je njihovu potpunu netoksičnost.
- Mogući mehanizam uklanjanja boje KV iz radnih medijuma, verovatno se postiže u dva koraka: vezivanje (adsorpcija) boje na površini ćelija bakterijskih kultura koju prati biorazgradnja boje KV bakterijskim enzimima, lignin i mangan peroksidaze.
- FTIR analizom su okarakterisane promene funkcionalnih grupa nakon modifikacije nosača od kafe i najveće promene su primećene kod nosača otpadna kafa-ClO₂. Poređenjem spektara snimljenih pre i posle imobilizacije komercijalne celulaze, primećeno je da se većina pikova, koji potiču od istih funkcionalnih grupa u poređenim spektrima, javlja na sličnim talasnim brojevima, uz manja ili veća pomeranja ili promene intenziteta. Adsorpcija enzima pretežno se odvijala posredstvom van der Valsovih, vodoničnih, hidrofobnih i/ili elektrostatičkih interakcija.
- Izmerene vrednosti tačke nultog naelektrisanja za nosače od kafe bile su: otpadna kafa 5,60, otpadna kafa-GIA 5,00, otpadna kafa-ClO₂ 2,25 i otpadna kafa-H₂O₂ 5,25. U najvećem opsegu vrednosti pH radnih rastvora, nosač otpadna kafa-ClO₂ je imala negativno naelektrisanu površinu.
- Na osnovu SEM mikrografa uočena je tipična porozna tekstura površine nosača od kafe, gde je nosač otpadna kafa-ClO₂ imao najbolje formiranu makroporoznu-mezoporoznu mrežu nakon modifikacije.
- Najefikasniji nosač za imobilizaciju celulaza je otpadna kafa-ClO₂.
- Optimalni uslovi pripreme nosača su: trajanje procesa modifikacije 30 min, 25 % rastvor hlór-dioksida i odnos aktivator/nosač 6 ml/mg.
- Uspostavljanje ravnotežnog stanja adsorpcije komercijalne celulaze, odigralo se u toku prvih 20 minuta.

- Kinetika adsorpcije enzima na otpadnoj kafi-ClO₂ je najbolje opisana modelom pseudo-drugog reda, na celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija.
- Maksimalni prinos i efikasnost imobilizacije celulaze poreklom iz *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, su redom, 70,84 % i 73,52 %.
- Celulaza iz CKS1 imobilisana na otpadnoj kafi-ClO₂ je bila stabilnija tokom skladištenja na 4 °C u periodu od 9 dana u poređenju sa slobodnim enzimom.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, naučni doprinos ove disertacije ogleda se u mogućnosti razvoja integrisanog postupka obrade otpadne vode kombinovanom primenom adsorpcije na agroindustrijskim nus-proizvodima i biorazgradnje katjonskih boja vrstama roda *Streptomyces*.

Drugi naučni doprinos je u praktičnoj primeni otpadne kafe modifikovane na netoksičan način, kao nosača za enzime celulaze. Njihovim direktnim izdvajanjem i prečišćavanjem iz složenih medijuma u kojima su sintetisane, mogu zajedno biti dalje primenjeni u industrijskom sektoru.

LITERATURA

1. A.R. Harifi-Mood, F. Hadavand-Mirzaie, Adsorption of Basic violet 16 from aqueous solutions by waste sugar beet pulp: kinetic, thermodynamic, and equilibrium isotherm studies, *Chemical Speciation & Bioavailability*. **2015**, 27, 8-14.
2. A.Y. Dursun, O. Tepe, G. Uslu, G. Dursun, Y. Saatci, Kinetics of Remazol Black B adsorption onto carbon prepared from sugar beet pulp, *Environmental Science and Pollution Research*. **2013**, 20, 2472-2483.
3. E. Pehlivan, B. Yanik, G. Ahmetli, M. Pehlivan, Equilibrium isotherm studies for the uptake of cadmium and lead ions onto sugar beet pulp, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 3520-3527.
4. L. Ayed, K. Chaieb, A. Cheref, A. Bakhrouf, Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by *Staphylococcus epidermidis*, *Desalination*. **2010**, 260, 137-146.
5. M. Rauf, S.S. Ashraf, Radiation induced degradation of dyes—an overview, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 166, 6-16.
6. F.H. Abdullah, M. Rauf, S.S. Ashraf, Photolytic oxidation of Safranin-O with H₂O₂, *Dyes and Pigments*. **2007**, 72, 349-352.
7. M.R. Malekbala, S. Hosseini, S. Kazemi Yazdi, S. Masoudi Soltani, M.R. Malekbala, The study of the potential capability of sugar beet pulp on the removal efficiency of two cationic dyes, *Chemical Engineering Research and Design*. **2012**, 90, 704-712.
8. G. McMullan, C. Meehan, A. Conneely, N. Kirby, T. Robinson, P. Nigam, I. Banat, R. Marchant, W. Smyth, Microbial decolourisation and degradation of textile dyes, *Applied microbiology and biotechnology*. **2001**, 56, 81-87.
9. N. Daneshvar, M. Ayazloo, A. Khataee, M. Pourhassan, Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp, *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 1176-1182.

10. S.T. Ambrósio, G.M. Campos-Takaki, Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions, *Bioresource Technology*. **2004**, 91, 69-75.
11. C. Pearce, J. Lloyd, J. Guthrie, The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review, *Dyes and Pigments*. **2003**, 58, 179-196.
12. V.K. Gupta, Suhas, Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review, *Journal of Environmental Management*. **2009**, 90, 2313-2342.
13. A.R. Lang, *Dyes and Pigments: New Research*, New York: Nova Science Publishers, Inc, **2009**.
14. A.S. Franca, L.S. Oliveira, M.E. Ferreira, Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds, *Desalination*. **2009**, 249, 267-272.
15. L.C. Oliveira, E. Pereira, I.R. Guimaraes, A. Vallone, M. Pereira, J.P. Mesquita, K. Sapag, Preparation of activated carbons from coffee husks utilizing FeCl₃ and ZnCl₂ as activating agents, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 165, 87-94.
16. S.L. Ching, M.S. Yusoff, H.A. Aziz, M. Umar, Influence of impregnation ratio on coffee ground activated carbon as landfill leachate adsorbent for removal of total iron and orthophosphate, *Desalination*. **2011**, 279, 225-234.
17. M. Hirata, N. Kawasaki, T. Nakamura, K. Matsumoto, M. Kabayama, T. Tamura, S. Tanada, Adsorption of dyes onto carbonaceous materials produced from coffee grounds by microwave treatment, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2002**, 254, 17-22.
18. H.S. Altundogan, N. Bahar, B. Mujde, F. Tumen, The use of sulphuric acid-carbonization products of sugar beet pulp in Cr(VI) removal, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 144, 255-264.
19. H.S. Altundogan, N.E. Arslan, F. Tumen, Copper removal from aqueous solutions by sugar beet pulp treated by NaOH and citric acid, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 149, 432-439.

20. V.M. Vučurović, R.N. Razmovski, M.N. Tekić, Methylene blue (cationic dye) adsorption onto sugar beet pulp: Equilibrium isotherm and kinetic studies, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **2012**, 43, 108-111.
21. M.D. Pavlović, A.V. Buntić, K.R. Mihajlovski, S.S. Šiler-Marinković, D.G. Antonović, Ž. Radovanović, S.I. Dimitrijević-Branković, Rapid cationic dye adsorption on polyphenol-extracted coffee grounds—A response surface methodology approach, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **2014**, 45, 1691-1699.
22. M.D. Pavlović, A.V. Buntić, S.S. Šiler-Marinković, D.G. Antonović, S.I. Dimitrijević-Branković, Recovery of (-)-epigallocatechingallate (EGCG) from aqueous solution by selective adsorption onto spent coffee grounds, *European Food Research and Technology*. **2015**, 241, 399-412.
23. M.D. Pavlović, A.V. Buntić, S.S. Šiler-Marinković, D.G. Antonović, M.D. Milutinović, N.R. Radovanović, S.I. Dimitrijević-Branković, Spent Coffee Grounds as Adsorbents for Pesticide Paraquat Removal from its Aqueous Solutions, in International Conference on Civil, Biological and Environmental Engineering, Istanbul, **2014**.
24. M.M. Kragović, A.S. Daković, S.Z. Milićević, Ž.T. Sekulić, S.K. Milonjić, Uticaj sorpcije organskog katjona na tačku nultog naelektrisanja prirodnog zeolita, *Hemijska industrija*. **2009**, 63, 331-335.
25. A. Bhatnagar, M. Sillanpää, Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment—a review, *Chemical Engineering Journal*. **2010**, 157, 277-296.
26. M. Rafatullah, O. Sulaiman, R. Hashim, A. Ahmad, Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 177, 70-80.
27. E. Worch, Adsorption Technology in Water Treatment: Fundamentals, Processes, and Modeling, Munchen, DEU: Walter de Gruyter, **2012**.

28. A. Mittal, J. Mittal, A. Malviya, D. Kaur, V.K. Gupta, Adsorption of hazardous dye crystal violet from wastewater by waste materials, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2010**, 343, 463-473.
29. G. Crini, Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review, *Bioresource Technology*. **2006**, 97, 1061-1085.
30. M.T. Yagub, T.K. Sen, S. Afroze, H.M. Ang, Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review, *Advances in Colloid and Interface Science*. **2014**, 209, 172-184.
31. W.J. Thomas, B. Crittenden, Adsorption Technology and Design, Jordan Hill, GBR: Butterworth-Heinemann, **1998**.
32. M.D. Pavlović, Izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz otpadne kafe i njeno potpuno iskorišćenje kao adsorbenta, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Departman za biotehnologiju i biohemisko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, **2015**.
33. A.P. Lim, A.Z. Aris, Continuous fixed-bed column study and adsorption modeling: Removal of cadmium (II) and lead (II) ions in aqueous solution by dead calcareous skeletons, *Biochemical Engineering Journal*. **2014**, 87, 50-61.
34. J.-x. Yu, J. Zhu, L.-y. Feng, X.-l. Cai, Y.-f. Zhang, R.-a. Chi, Removal of cationic dyes by modified waste biosorbent under continuous model: Competitive adsorption and kinetics, *Arabian Journal of Chemistry*. **2015**.
35. V. Vimonses, S. Lei, B. Jin, C.W.K. Chow, C. Saint, Kinetic study and equilibrium isotherm analysis of Congo Red adsorption by clay materials, *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 148, 354-364.
36. C. Folch-Cano, C. Olea-Azar, H. Speisky, Structural and thermodynamic factors on the adsorption process of phenolic compounds onto polyvinylpolypyrrolidone, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2013**, 418, 105-111.
37. M.T. Yagub, T.K. Sen, H. Ang, Equilibrium, kinetics, and thermodynamics of methylene blue adsorption by pine tree leaves, *Water, Air, & Soil Pollution*. **2012**, 223, 5267-5282.

38. I.D. Mall, V.C. Srivastava, N.K. Agarwal, Removal of Orange-G and Methyl Violet dyes by adsorption onto bagasse fly ash—kinetic study and equilibrium isotherm analyses, *Dyes and Pigments*. **2006**, 69, 210-223.
39. I.A.W. Tan, A.L. Ahmad, B.H. Hameed, Adsorption of basic dye on high-surface-area activated carbon prepared from coconut husk: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 154, 337-346.
40. N.K. Amin, Removal of direct blue-106 dye from aqueous solution using new activated carbons developed from pomegranate peel: adsorption equilibrium and kinetics, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 165, 52-62.
41. A. Dada, A. Olalekan, A. Olatunya, O. Dada, Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn²⁺ onto phosphoric acid modified rice husk, *Journal of Applied Chemistry*. **2012**, 3, 38-45.
42. M. Rehakova, S. Čuvanová, M. Dzivak, J. Rimár, Z. Gaval’Ova, Agricultural and agrochemical uses of natural zeolite of the clinoptilolite type, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. **2004**, 8, 397-404.
43. J. Weitkamp, Zeolites and catalysis, *Solid State Ionics*. **2000**, 131, 175-188.
44. J. Lin, S. Zhan, M. Fang, X. Qian, H. Yang, Adsorption of basic dye from aqueous solution onto fly ash, *Journal of Environmental Management*. **2008**, 87, 193-200.
45. M.H. Entezari, Z. Sharif Al-Hoseini, Sono-sorption as a new method for the removal of methylene blue from aqueous solution, *Ultrasonics Sonochemistry*. **2007**, 14, 599-604.
46. P.S. Murthy, M. Madhava Naidu, Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review, *Resources, Conservation and Recycling*. **2012**, 66, 45-58.
47. A. Saeed, M. Sharif, M. Iqbal, Application potential of grapefruit peel as dye sorbent: Kinetics, equilibrium and mechanism of crystal violet adsorption, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 179, 564-572.
48. M. Doble, A. Kumar, Biotreatment of Industrial Effluents, Burlington, MA, USA: Butterworth-Heinemann, **2005**.

49. M.A.M. Salleh, D.K. Mahmoud, W.A.W.A. Karim, A. Idris, Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: A comprehensive review, *Desalination*. **2011**, 280, 1-13.
50. P. Esquivel, V.M. Jiménez, Functional properties of coffee and coffee by-products, *Food Research International*. **2012**, 46, 488-495.
51. I. Safarik, K. Horska, B. Svobodova, M. Safarikova, Magnetically modified spent coffee grounds for dyes removal, *European Food Research and Technology*. **2012**, 234, 345-350.
52. N. Azouaou, Z. Sadaoui, A. Djaafri, H. Mokaddem, Adsorption of cadmium from aqueous solution onto untreated coffee grounds: Equilibrium, kinetics and thermodynamics, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 184, 126-134.
53. Z. Aksu, İ.A. İşoğlu, Removal of copper(II) ions from aqueous solution by biosorption onto agricultural waste sugar beet pulp, *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 3031-3044.
54. Z. Reddad, C. Gerente, Y. Andres, P. Le Cloirec, Adsorption of several metal ions onto a low-cost biosorbent: kinetic and equilibrium studies, *Environmental science & technology*. **2002**, 36, 2067-2073.
55. Z. Aksu, İ.A. Isoglu, Use of agricultural waste sugar beet pulp for the removal of Gemazol turquoise blue-G reactive dye from aqueous solution, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 137, 418-430.
56. N. Gertsen, L. Sønderby, *Air, Water and Soil Pollution Science and Technology : Water Purification* 2009, New York, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc.
57. T. Srinivas, *Environmental Biotechnology*, Daryaganj, Delhi, IND: New Age International, **2008**.
58. D. Dukić, L. Gavrilović, *Hidrologija*, Beograd, **2006**,
59. M.R. Sohrabi, M. Ghavami, Photocatalytic degradation of Direct Red 23 dye using UV/TiO₂: Effect of operational parameters, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 153, 1235-1239.
60. G.R. Chatwal, M. Arora, *Synthetic Dyes*, Mumbai, IND: Himalaya Publishing House, **2009**.

61. N. Koprivanac, H. Kusic, Hazardous Organic Pollutants in Colored Wastewaters, New York, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc, **2009**.
62. Y.M. Kolekar, S.P. Pawar, K.R. Gawai, P.D. Lokhande, Y.S. Shouche, K.M. Kodam, Decolorization and degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10, by *Bacillus fusiformis* KMK5 isolated from the textile dye contaminated soil, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 8999-9003.
63. V.V. Dawkar, U.U. Jadhav, G.S. Ghodake, S.P. Govindwar, Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS, *Biodegradation*. **2009**, 20, 777-787.
64. J.P. Samuelson, Industrial Waste: Environmental Impact, Disposal and Treatment, New York, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc, **2009**.
65. B.D. Tony, D. Goyal, S. Khanna, Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium, *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2009**, 63, 462-469.
66. B.-Y. Chen, K.-W. Lin, Y.-M. Wang, C.-Y. Yen, Revealing interactive toxicity of aromatic amines to azo dye decolorizer *Aeromonas hydrophila*, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 166, 187-194.
67. T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresource Technology*. **2001**, 77, 247-255.
68. J. Kiernan, Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes, *Biotechnic & histochemistry*. **2001**, 76, 261-278.
69. G. Li, L. Peng, Z. Ding, Y. Liu, Z. Gu, L. Zhang, G. Shi, Decolorization and biodegradation of triphenylmethane dyes by a novel *Rhodococcus qingshengii* JB301 isolated from sawdust, *Annals of microbiology*. **2014**, 64, 1575-1586.
70. S. Mona, A. Kaushik, C.P. Kaushik, Waste biomass of *Nostoc linckia* as adsorbent of crystal violet dye: Optimization based on statistical model, *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2011**, 65, 513-521.

71. S. Nouren, H.N. Bhatti, Mechanistic study of degradation of Basic violet 3 by Citrus limon peroxidase and phytotoxicity assessment of its degradation products, *Biochemical Engineering Journal*. **2015**, 95, 9-19.
72. Hemijska struktura kristal violet, www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.
73. G. Ciric-Marjanovic, N.V. Blinova, M. Trchová, J. Stejskal, Chemical oxidative polymerization of safranines, *The Journal of Physical Chemistry B*. **2007**, 111, 2188-2199.
74. V.K. Gupta, R. Jain, A. Mittal, M. Mathur, S. Sikarwar, Photochemical degradation of the hazardous dye Safranin-T using TiO₂ catalyst, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2007**, 309, 464-469.
75. Hemijska struktura safranina, www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.
76. N. Zaghbani, A. Hafiane, M. Dhahbi, Removal of Safranin T from wastewater using micellar enhanced ultrafiltration, *Desalination*. **2008**, 222, 348-356.
77. B.K. Körbahti, M.A. Rauf, Application of response surface analysis to the photolytic degradation of Basic Red 2 dye, *Chemical Engineering Journal*. **2008**, 138, 166-171.
78. R. Perry, D. Green, J. Maloney, Perry's Chemical Engineers' Handbook, McGraw-Hill, New York, **1997**.
79. S. Gupta, B.V. Babu, Removal of toxic metal Cr(VI) from aqueous solutions using sawdust as adsorbent: Equilibrium, kinetics and regeneration studies, *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 150, 352-365.
80. N.S. Evangelista-Barreto, C.D. Albuquerque, R.H.S. Vieira, G.M. Campos-Takaki, Cometary decolorization of the reactive azo dye orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986, *Textile Research Journal*. **2009**, 79, 1266-1273.
81. R. Dhodapkar, N.N. Rao, S.P. Pande, T. Nandy, S. Devotta, Adsorption of cationic dyes on Jalshakti®, super absorbent polymer and photocatalytic regeneration of the adsorbent, *Reactive and Functional Polymers*. **2007**, 67, 540-548.
82. F.A. Pavan, E.S. Camacho, E.C. Lima, G.L. Dotto, V.T.A. Branco, S.L.P. Dias, Formosa papaya seed powder (FPSP): Preparation, characterization and application

- as an alternative adsorbent for the removal of crystal violet from aqueous phase, *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **2014**, 2, 230-238.
83. G. Bayramoglu, B. Altintas, M.Y. Arica, Adsorption kinetics and thermodynamic parameters of cationic dyes from aqueous solutions by using a new strong cation-exchange resin, *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 152, 339-346.
84. A. Blanco-Flores, A. Colín-Cruz, E. Gutiérrez-Segura, V. Sánchez-Mendieta, D. Solís-Casados, M. Garrudo-Guirado, R. Batista-González, Efficient removal of crystal violet dye from aqueous solutions by vitreous tuff mineral, *Environmental technology*. **2014**, 35, 1508-1519.
85. K.P. Singh, S. Gupta, A.K. Singh, S. Sinha, Optimizing adsorption of crystal violet dye from water by magnetic nanocomposite using response surface modeling approach, *Journal of Hazardous Materials*. **2011**, 186, 1462-1473.
86. K. Vijayaraghavan, Y. Premkumar, J. Jegan, Malachite green and crystal violet biosorption onto coco-peat: characterization and removal studies, *Desalination and Water Treatment*. **2015**, 1-9.
87. I. Šafařík, Removal of organic polycyclic compounds from water solutions with a magnetic chitosan based sorbent bearing copper phthalocyanine dye, *Water Research*. **1995**, 29, 101-105.
88. H. Parab, M. Sudersanan, N. Shenoy, T. Pathare, B. Vaze, Use of agro-industrial wastes for removal of basic dyes from aqueous solutions, *CLEAN–Soil, Air, Water*. **2009**, 37, 963-969.
89. K. Mohanty, J.T. Naidu, B.C. Meikap, M.N. Biswas, Removal of Crystal Violet from Wastewater by Activated Carbons Prepared from Rice Husk, *Industrial & engineering chemistry research*. **2006**, 45, 5165-5171.
90. R. Ahmad, Studies on adsorption of crystal violet dye from aqueous solution onto coniferous pinus bark powder (CPBP), *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 171, 767-773.
91. S. Senthilkumar, P. Kalaamani, C.V. Subburaam, Liquid phase adsorption of Crystal violet onto activated carbons derived from male flowers of coconut tree, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 136, 800-808.

92. Y. Lin, X. He, G. Han, Q. Tian, W. Hu, Removal of Crystal Violet from aqueous solution using powdered mycelial biomass of *Ceriporia lacerata* P2, *Journal of Environmental Sciences*. **2011**, 23, 2055-2062.
93. F. Akbal, Adsorption of basic dyes from aqueous solution onto pumice powder, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2005**, 286, 455-458.
94. S. Chakraborty, S. Chowdhury, P. Das Saha, Adsorption of Crystal Violet from aqueous solution onto NaOH-modified rice husk, *Carbohydrate Polymers*. **2011**, 86, 1533-1541.
95. C.A. Başar, Applicability of the various adsorption models of three dyes adsorption onto activated carbon prepared waste apricot, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 135, 232-241.
96. S. Madhavakrishnan, K. Manickavasagam, R. Vasanthakumar, K. Rasappan, R. Mohanraj, S. Pattabhi, Adsorption of Crystal Violet Dye from Aqueous Solution Using *Ricinus Communis* Pericarp Carbon as an Adsorbent, *E-Journal of Chemistry*. **2009**, 6.
97. F. Atmani, A. Bensmaili, N. Mezenner, Synthetic textile effluent removal by skin almonds waste, *J. Environ. Sci. Technol.* **2009**, 2, 153-169.
98. G. Annadurai, R.-S. Juang, D.-J. Lee, Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*. **2002**, 92, 263-274.
99. G.O. El-Sayed, Removal of methylene blue and crystal violet from aqueous solutions by palm kernel fiber, *Desalination*. **2011**, 272, 225-232.
100. L. Zhang, H. Zhang, W. Guo, Y. Tian, Removal of malachite green and crystal violet cationic dyes from aqueous solution using activated sintering process red mud, *Applied Clay Science*. **2014**, 93–94, 85-93.
101. R. Kumar, R. Ahmad, Biosorption of hazardous crystal violet dye from aqueous solution onto treated ginger waste (TGW), *Desalination*. **2011**, 265, 112-118.
102. T. Madrakian, A. Afkhami, M. Ahmadi, Adsorption and kinetic studies of seven different organic dyes onto magnetite nanoparticles loaded tea waste and removal

- of them from wastewater samples, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2012**, 99, 102-109.
103. S. Chakraborty, S. Chowdhury, P. Saha, Artificial neural network (ANN) modeling of dynamic adsorption of crystal violet from aqueous solution using citric-acid-modified rice (*Oryza sativa*) straw as adsorbent, *Clean Technologies and Environmental Policy*. **2013**, 15, 255-264.
104. B.H. Hameed, Equilibrium and kinetic studies of methyl violet sorption by agricultural waste, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 154, 204-212.
105. S. Chowdhury, S. Chakraborty, P. Saha, Removal of Crystal Violet from Aqueous Solution by Adsorption onto Eggshells: Equilibrium, Kinetics, Thermodynamics and Artificial Neural Network Modeling, *Waste and Biomass Valorization*. **2013**, 4, 655-664.
106. Y. Önal, Kinetics of adsorption of dyes from aqueous solution using activated carbon prepared from waste apricot, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 137, 1719-1728.
107. H. Ali, Biodegradation of synthetic dyes—a review, *Water, Air, & Soil Pollution*. **2010**, 213, 251-273.
108. E. Forgacs, T. Cserhádi, G. Oros, Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environment International*. **2004**, 30, 953-971.
109. X.Q. Yang, X.X. Zhao, C.Y. Liu, Y. Zheng, S.J. Qian, Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase, *Process Biochemistry*. **2009**, 44, 1185-1189.
110. S.H. Chen, A.S. Yien Ting, Biosorption and biodegradation potential of triphenylmethane dyes by newly discovered *Penicillium simplicissimum* isolated from indoor wastewater sample, *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2015**, 103, 1-7.
111. S. Ren, J. Guo, G. Zeng, G. Sun, Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain, *Applied microbiology and biotechnology*. **2006**, 72, 1316-1321.

112. S.-Y. An, S.-K. Min, I.-H. Cha, Y.-L. Choi, Y.-S. Cho, C.-H. Kim, Y.-C. Lee, Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp, *Biotechnology Letters*. **2002**, 24, 1037-1040.
113. H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, S. Ōmura, Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nature biotechnology*. **2003**, 21, 526-531.
114. S. Bentley, K. Chater, A.-M. Cerdeno-Tarraga, G. Challis, N. Thomson, K. James, D. Harris, M. Quail, H. Kieser, D. Harper, Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Nature*. **2002**, 417, 141-147.
115. S. Goszczynski, A. Paszczynski, M. Pasti-Grigsby, R. Crawford, D. Crawford, New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, *Journal of Bacteriology*. **1994**, 176, 1339-1347.
116. K.-S. Hwang, H.U. Kim, P. Charusanti, B.Ø. Palsson, S.Y. Lee, Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites, *Biotechnology advances*. **2014**, 32, 255-268.
117. A. Stolz, Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes, *Applied microbiology and biotechnology*. **2001**, 56, 69-80.
118. K. Niladevi, P. Prema, Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 4583-4589.
119. B.K. Simpson, L.M. Nollet, S. Benjakul, G. Paliyath, Y. Hui, Food biochemistry and food processing, John Wiley & Sons, **2012**.
120. R.B. Silverman, Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions, Academic Press: San Diego, **2002**.
121. F.B.-O. Daoud, S. Kaddour, T. Sadoun, Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: kinetics and equilibrium studies, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2010**, 75, 93-99.

122. E. Katchalski-Katzir, Immobilized enzymes—learning from past successes and failures, *Trends in biotechnology*. **1993**, 11, 471-478.
123. K. Khoshnevisan, A.-K. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, M. Tabatabaei, Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 171, 669-673.
124. K.M. Ho, X. Mao, L. Gu, P. Li, Facile Route to Enzyme Immobilization: Core–Shell Nanoenzyme Particles Consisting of Well-Defined Poly (methyl methacrylate) Cores and Cellulase Shells, *Langmuir*. **2008**, 24, 11036-11042.
125. D.Z. Knežević-Jugović, *Enzimsko inženjstvo*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
126. G. Tripathi, Enzyme Biotechnology, Jaipur, IND: ABD Publishers, **2009**.
127. K. Mosbach, Immobilized enzymes, *Trends in Biochemical Sciences*. **1980**, 5, 1-3.
128. S. Hirsh, M. Bilek, N. Nosworthy, A. Kondyurin, C. Dos Remedios, D. McKenzie, A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture, *Langmuir*. **2010**, 26, 14380-14388.
129. L. Zang, J. Qiu, X. Wu, W. Zhang, E. Sakai, Y. Wei, Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization, *Industrial & engineering chemistry research*. **2014**, 53, 3448-3454.
130. A. Takimoto, T. Shiomi, K. Ino, T. Tsunoda, A. Kawai, F. Mizukami, K. Sakaguchi, Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15), *Microporous and Mesoporous Materials*. **2008**, 116, 601-606.
131. A. Dinçer, A. Telefoncu, Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2007**, 45, 10-14.
132. H.J. Gilbert, G.P. Hazlewood, Bacterial cellulases and xylanases, *Microbiology*. **1993**, 139, 187-194.
133. K.R. Mihajlovski, M.B. Carević, M.L. Dević, S. Šiler-Marinković, M.D. Rajilić-Stojanović, S. Dimitrijević-Branković, Lignocellulosic waste material as substrate

- for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2015**, 104, 426-434.
134. B. Simonovič, B. Tomšič, B. Orel, *Bacteriology Research Developments : Biodegradation of Cellulose Fibers*, New York, USA: Nova Science Publishers, Inc, **2010**.
135. Q. Xu, W. Adney, S.-Y. Ding, H. Michael, *Cellulases For Biomass Conversion*, in *Industrial Enzymes*, J. Polaina and A. MacCabe, Editors. 2007, Springer Netherlands. p. 35-50.
136. I.R. Tebeka, A.G. Silva, D.F. Petri, Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase, *Langmuir*. **2009**, 25, 1582-1587.
137. L.M. Robson, G.H. Chambliss, Cellulases of bacterial origin, *Enzyme and Microbial Technology*. **1989**, 11, 626-644.
138. Y. Habibi, L.A. Lucia, O.J. Rojas, Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications, *Chemical reviews*. **2010**, 110, 3479-3500.
139. M.-O. Arja, *Cellulases in the Textile Industry*, in *Industrial Enzymes*, J. Polaina and A. MacCabe, Editors. 2007, Springer Netherlands. p. 51-63.
140. R.H.-Y. Chang, J. Jang, K.C.-W. Wu, Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to-glucose conversion, *Green Chemistry*. **2011**, 13, 2844-2850.
141. S.B. Hartono, S.Z. Qiao, J. Liu, K. Jack, B.P. Ladewig, Z. Hao, G.Q.M. Lu, Functionalized mesoporous silica with very large pores for cellulase immobilization, *The Journal of Physical Chemistry C*. **2010**, 114, 8353-8362.
142. X. Shen, L. Xia, Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07, *Process Biochemistry*. **2004**, 39, 1363-1367.
143. X. Mao, G. Guo, J. Huang, Z. Du, Z. Huang, L. Ma, P. Li, L. Gu, A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2006**, 81, 189-195.
144. N.K. Pazarlioğlu, M. Sarişik, A. Telefoncu, Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases, *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 767-771.

145. K.R. Mihajlovski, Poljoprivredni i industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Departman za biotehnologiju i biohemisko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd. **2016**.
146. N.Ž. Šekuljica, N.Ž. Prlainović, J.R. Jovanović, A.B. Stefanović, S.Ž. Grbavčić, D.Ž. Mijin, Z.D. Knežević-Jugović, Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye, *Hemijska industrija*. **2016**, 28-28.
147. D.B. Magalhães, M.E.A. de Carvalho, E. Bon, J.S.A. Neto, S.H. Kling, Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate, *Biotechnology techniques*. **1996**, 10, 273-276.
148. A. Bholay, B.V. Borkhataria, P.U. Jadhav, K.S. Palekar, M.V. Dhalkari, P. Nalawade, Bacterial lignin peroxidase: A tool for biobleaching and biodegradation of industrial effluents, *Universal Journal of Environmental Research and Technology*. **2012**, 2, 58-64.
149. D.S. Arora, P.K. Gill, Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2005**, 21, 1021-1028.
150. G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*. **1959**, 31, 426-428.
151. J.S. van Dyk, M. Sakka, K. Sakka, B.I. Pletschke, The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex, *Enzyme and Microbial Technology*. **2009**, 45, 372-378.
152. A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay, Response surface methodology, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. **2010**, 2, 128-149.
153. N. Aslan, Y. Cebeci, Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals, *Fuel*. **2007**, 86, 90-97.
154. M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*. **2008**, 76, 965-977.

155. M. Arulkumar, P. Sathishkumar, T. Palvannan, Optimization of Orange G dye adsorption by activated carbon of *Thespesia populnea* pods using response surface methodology, *Journal of Hazardous Materials*. **2011**, 186, 827-834.
156. S. Mona, A. Kaushik, C.P. Kaushik, Biosorption of reactive dye by waste biomass of *Nostoc linckia*, *Ecological Engineering*. **2011**, 37, 1589-1594.
157. R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*. **2013**, 42, 6223-6235.
158. N. Mubarak, J. Wong, K. Tan, J. Sahu, E. Abdullah, N. Jayakumar, P. Ganesan, Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2014**, 107, 124-131.
159. G. Dursun, H. Cicek, A.Y. Dursun, Adsorption of phenol from aqueous solution by using carbonised beet pulp, *Journal of Hazardous Materials*. **2005**, 125, 175-182.
160. R. Sun, S. Hughes, Extraction and physico-chemical characterization of pectins from sugar beet pulp, *Polymer journal*. **1998**, 30, 671-677.
161. Y. Mata, M. Blázquez, A. Ballester, F. González, J. Muñoz, Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: preparation and determination of biosorption and desorption characteristics, *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 150, 289-301.
162. R. Lafi, A. ben Fradj, A. Hafiane, B.H. Hameed, Coffee waste as potential adsorbent for the removal of basic dyes from aqueous solution, *Korean Journal of Chemical Engineering*. **2014**, 31, 2198-2206.
163. A. Pal, S. Pan, S. Saha, Synergistically improved adsorption of anionic surfactant and crystal violet on chitosan hydrogel beads, *Chemical Engineering Journal*. **2013**, 217, 426-434.
164. G. Crini, H.N. Peindy, F. Gimbert, C. Robert, Removal of CI Basic Green 4 (Malachite Green) from aqueous solutions by adsorption using cyclodextrin-based adsorbent: Kinetic and equilibrium studies, *Separation and Purification Technology*. **2007**, 53, 97-110.
165. C.P. Nanseu-Njiki, G.K. Dedzo, E. Ngameni, Study of the removal of paraquat from aqueous solution by biosorption onto Ayous (*Triplochiton schleroxyylon*) sawdust, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 179, 63-71.

166. E. Pehlivan, S. Cetin, B. Yanik, Equilibrium studies for the sorption of zinc and copper from aqueous solutions using sugar beet pulp and fly ash, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 135, 193-199.
167. Z. Aksu, I.A. Isoglu, Use of dried sugar beet pulp for binary biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye and copper (II) ions: equilibrium modeling, *Chemical Engineering Journal*. **2007**, 127, 177-188.
168. S.T. Akar, D. Yilmazer, S. Celik, Y.Y. Balk, T. Akar, Effective biodecolorization potential of surface modified lignocellulosic industrial waste biomass, *Chemical Engineering Journal*. **2015**, 259, 286-292.
169. V.K. Garg, R. Gupta, A. Bala Yadav, R. Kumar, Dye removal from aqueous solution by adsorption on treated sawdust, *Bioresource Technology*. **2003**, 89, 121-124.
170. V.K. Garg, M. Amita, R. Kumar, R. Gupta, Basic dye (methylene blue) removal from simulated wastewater by adsorption using Indian Rosewood sawdust: a timber industry waste, *Dyes and Pigments*. **2004**, 63, 243-250.
171. B.H. Hameed, A.L. Ahmad, K.N.A. Latiff, Adsorption of basic dye (methylene blue) onto activated carbon prepared from rattan sawdust, *Dyes and Pigments*. **2007**, 75, 143-149.
172. B.H. Hameed, D.K. Mahmoud, A.L. Ahmad, Equilibrium modeling and kinetic studies on the adsorption of basic dye by a low-cost adsorbent: Coconut (*Cocos nucifera*) bunch waste, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 158, 65-72.
173. H. Patel, R.T. Vashi, Adsorption of Crystal Violet Dye onto Tamarind Seed Powder, *E-Journal of Chemistry*. **2010**, 7, 975-984.
174. N.K. Amin, Removal of reactive dye from aqueous solutions by adsorption onto activated carbons prepared from sugarcane bagasse pith, *Desalination*. **2008**, 223, 152-161.
175. F. Pechar, D. Rykl, Infrared spectra of natural zeolites of the stilbite group, *Chem. zvesti*. **1981**, 35, 189-202.

176. N. Mansouri, N. Rikhtegar, H.A. Panahi, F. Atabi, B.K. Shahraki, Porosity, characterization and structural properties of natural zeolite-clinoptilolite-as a sorbent, *Environment Protection Engineering*. **2013**, 39.
177. R. Han, Y. Wang, Q. Sun, L. Wang, J. Song, X. He, C. Dou, Malachite green adsorption onto natural zeolite and reuse by microwave irradiation, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 175, 1056-1061.
178. M.A. Ahmad, N.K. Rahman, Equilibrium, kinetics and thermodynamic of Remazol Brilliant Orange 3R dye adsorption on coffee husk-based activated carbon, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 170, 154-161.
179. S. Wang, H. Li, L. Xu, Application of zeolite MCM-22 for basic dye removal from wastewater, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2006**, 295, 71-78.
180. S.K. Alpat, Ö. Özbayrak, Ş. Alpat, H. Akçay, The adsorption kinetics and removal of cationic dye, Toluidine Blue O, from aqueous solution with Turkish zeolite, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 151, 213-220.
181. R. Han, Y. Wang, Q. Sun, L. Wang, J. Song, X. He, C. Dou, Malachite green adsorption onto natural zeolite and reuse by microwave irradiation, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 175, 1056-1061.
182. E. Alver, A.Ü. Metin, Anionic dye removal from aqueous solutions using modified zeolite: Adsorption kinetics and isotherm studies, *Chemical Engineering Journal*. **2012**, 200–202, 59-67.
183. V.V. Panic, S.J. Velickovic, Removal of model cationic dye by adsorption onto poly(methacrylic acid)/zeolite hydrogel composites: Kinetics, equilibrium study and image analysis, *Separation and Purification Technology*. **2014**, 122, 384-394.
184. S. Wang, Z.H. Zhu, Characterisation and environmental application of an Australian natural zeolite for basic dye removal from aqueous solution, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 136, 946-952.
185. Y. Khambhaty, K. Mody, S. Basha, Efficient removal of Brilliant Blue G (BBG) from aqueous solutions by marine *Aspergillus wentii*: Kinetics, equilibrium and process design, *Ecological Engineering*. **2012**, 41, 74-83.

186. Y. Khambhaty, K. Mody, S. Basha, B. Jha, Equilibrium modeling for biosorption of safranin onto chemically modified biomass of marine *Aspergillus wentii*, *Water, Air, & Soil Pollution*. **2011**, 215, 679-691.
187. V. Meshko, L. Markovska, M. Mincheva, A.E. Rodrigues, Adsorption of basic dyes on granular activated carbon and natural zeolite, *Water Research*. **2001**, 35, 3357-3366.
188. G. Atun, G. Hisarlı, A.E. Kurtoğlu, N. Ayar, A comparison of basic dye adsorption onto zeolitic materials synthesized from fly ash, *Journal of Hazardous Materials*. **2011**, 187, 562-573.
189. V. Vadivelan, K.V. Kumar, Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2005**, 286, 90-100.
190. M. Qiu, C. Qian, J. Xu, J. Wu, G. Wang, Studies on the adsorption of dyes into clinoptilolite, *Desalination*. **2009**, 243, 286-292.
191. S. Liu, Y. Ding, P. Li, K. Diao, X. Tan, F. Lei, Y. Zhan, Q. Li, B. Huang, Z. Huang, Adsorption of the anionic dye Congo red from aqueous solution onto natural zeolites modified with N,N-dimethyl dehydroabietylamine oxide, *Chemical Engineering Journal*. **2014**, 248, 135-144.
192. M. Akgül, Enhancement of the anionic dye adsorption capacity of clinoptilolite by Fe³⁺-grafting, *Journal of Hazardous Materials*. **2014**, 267, 1-8.
193. M. Akgül, A. Karabakan, Promoted dye adsorption performance over desilicated natural zeolite, *Microporous and Mesoporous Materials*. **2011**, 145, 157-164.
194. R. Han, J. Zhang, P. Han, Y. Wang, Z. Zhao, M. Tang, Study of equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters about methylene blue adsorption onto natural zeolite, *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 145, 496-504.
195. X. Jin, M.-q. Jiang, X.-q. Shan, Z.-g. Pei, Z. Chen, Adsorption of methylene blue and orange II onto unmodified and surfactant-modified zeolite, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2008**, 328, 243-247.

196. D. Kalyani, A. Telke, R. Dhanve, J. Jadhav, Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 163, 735-742.
197. J.A. Bumpus, B.J. Brock, Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*. **1988**, 54, 1143-1150.
198. P. Ollikka, K. Alhonmäki, V.-M. Leppänen, T. Glumoff, T. Rajjola, I. Suominen, Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*. **1993**, 59, 4010-4016.
199. G. Parshetti, S. Parshetti, D. Kalyani, R.-a. Doong, S. Govindwar, Industrial dye decolorizing lignin peroxidase from *Kocuria rosea* MTCC 1532, *Annals of microbiology*. **2012**, 62, 217-223.
200. L. Ayed, K. Chaieb, A. Cheref, A. Bakhrouf, Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2009**, 25, 705-711.
201. U. Shedbalkar, R. Dhanve, J. Jadhav, Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 157, 472-479.
202. T. Hadibarata, A.R.M. Yusoff, A. Aris, T. Hidayat, R.A. Kristanti, Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by laccase of a newly isolated *Armillaria* sp. F022, *Water, Air, & Soil Pollution*. **2012**, 223, 1045-1054.
203. P. Zucca, A. Rescigno, M. Pintus, A.C. Rinaldi, E. Sanjust, Degradation of textile dyes using immobilized lignin peroxidase-like metalloporphines under mild experimental conditions, *Chem Cent J*. **2012**, 6, 1-8.
204. M. Tekere, A.Y. Mswaka, R. Zvauya, J.S. Read, Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi, *Enzyme and Microbial Technology*. **2001**, 28, 420-426.

205. S. Kalme, G. Parshetti, S. Jadhav, S. Govindwar, Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112, *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 1405-1410.
206. S.S. Khan, A. Arunarani, P. Chandran, Biodegradation of Basic Violet 3 and Acid Blue 93 by *Pseudomonas putida*, *CLEAN–Soil, Air, Water*. **2015**, 43, 67-72.
207. S. Preethi, A. Sivasamy, S. Sivanesan, V. Ramamurthi, G. Swaminathan, Removal of safranin basic dye from aqueous solutions by adsorption onto corncob activated carbon, *Industrial & engineering chemistry research*. **2006**, 45, 7627-7632.
208. C.J. Ogugbue, T. Sawidis, N.A. Oranusi, Bioremoval of chemically different synthetic dyes by *Aeromonas hydrophila* in simulated wastewater containing dyeing auxiliaries, *Annals of microbiology*. **2012**, 62, 1141-1153.
209. M. Brigante, G. Zanini, M. Avena, Effect of humic acids on the adsorption of paraquat by goethite, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 184, 241-247.
210. M.Y. Arica, G. Bayramoğlu, Biosorption of Reactive Red-120 dye from aqueous solution by native and modified fungus biomass preparations of *Lentinus sajor-caju*, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 149, 499-507.
211. D.A. Sidhoum, M. Socías-Viciano, M. Ureña-Amate, A. Derdour, E. González-Pradas, N. Debbagh-Boutarbouch, Removal of paraquat from water by an Algerian bentonite, *Applied Clay Science*. **2013**, 83, 441-448.
212. J. Li, L.-S. Li, L. Xu, Hierarchically macro/mesoporous silica sphere: A high efficient carrier for enzyme immobilization, *Microporous and Mesoporous Materials*. **2016**, 231, 147-153.
213. M.A.F.R. Al-Khatib, M. Alam, R. Mohammed, Statistical modelling optimisation of cellulase enzyme immobilisation on functionalised multi-walled carbon nanotubes for empty fruit bunches degradation, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **2012**, 6, 30-38.
214. E. Ximenes, Y. Kim, N. Mosier, B. Dien, M. Ladisch, Deactivation of cellulases by phenols, *Enzyme and Microbial Technology*. **2011**, 48, 54-60.
215. M. Hartmann, X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas—benefits and challenges, *Chemical Society Reviews*. **2013**, 42, 6277-6289.

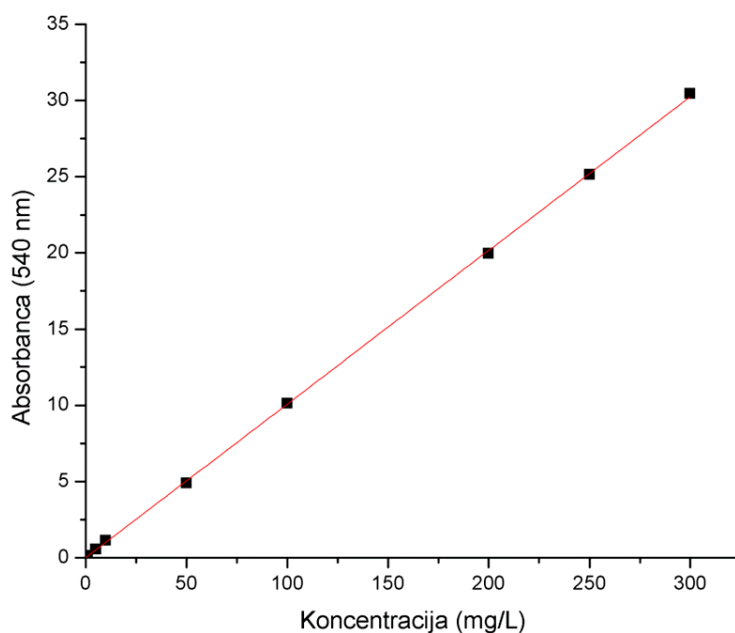
216. A. Tejirian, F. Xu, Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds, *Enzyme and Microbial Technology*. **2011**, 48, 239-247.
217. L. Ferreira, M. Ramos, J. Dordick, M. Gil, Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2003**, 21, 189-199.
218. L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G.D.-O.C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions, *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39, 877-882.
219. H.-W. Leung, Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2001**, 49, 26-39.
220. B. Krajewska, Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology*. **2004**, 35, 126-139.
221. J.-S. Lv, X.-Y. Liu, J.-X. Xu, Y.-F. Deng, Z. Wu, Y.-M. Wang, M.-Y. Fan, H. Xu, Preparation and properties of adsorption material from corn stalks core when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes, *Industrial Crops and Products*. **2013**, 50, 787-796.
222. Y. Yu, J. Yuan, Q. Wang, X. Fan, P. Wang, X. Sun, Immobilization of cellulases on the reversibly soluble polymer Eudragit S-100 for cotton treatment, *Engineering in Life Sciences*. **2013**, 13, 194-200.
223. R. Kumar, C.E. Wyman, An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids, *Enzyme and Microbial Technology*. **2008**, 42, 426-433.
224. J. Zhou, Immobilization of cellulase on a reversibly soluble– insoluble support: properties and application, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 6741-6746.

225. L.M. Prieto, R.G. Ricordi, R.C. Kuhn, E.L. Foletto, M.A. Mazutti, C.A.V. Burkert, Evaluation of β -galactosidase adsorption into pre-treated carbon, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **2014**, 3, 26-29.
226. J.K. Ko, E. Ximenes, Y. Kim, M.R. Ladisch, Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods, *Biotechnology and bioengineering*. **2015**, 112, 447-456.
227. M. Tu, X. Pan, J.N. Saddler, Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, 7771-7778.
228. S.I. Mussatto, L.M. Carneiro, J.P. Silva, I.C. Roberto, J.A. Teixeira, A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds, *Carbohydrate Polymers*. **2011**, 83, 368-374.
229. R.E. Abraham, M.L. Verma, C.J. Barrow, M. Puri, Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass, *Biotechnology for biofuels*. **2014**, 7, 1.
230. N.A. Nikonenko, D.K. Buslov, N.I. Sushko, R.G. Zhbakov, Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkages in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution, *Biopolymers*. **2000**, 57, 257-262.
231. R. Du, R. Su, X. Li, X. Tantai, Z. Liu, J. Yang, W. Qi, Z. He, Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment, *Cellulose*. **2012**, 19, 371-380.

PRILOG 1

STANDARDNE KRIVE

1.1. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet



Slika P-1.1. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet u vodenom rastvoru

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

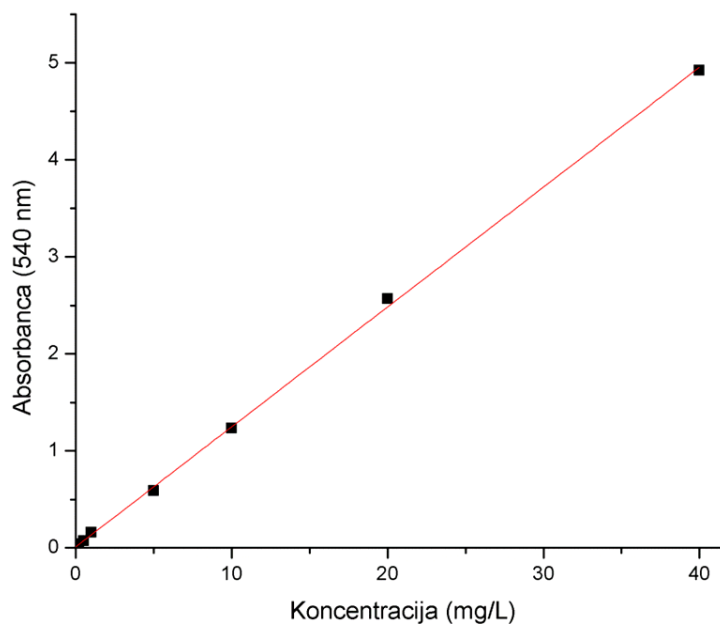
$$Y = 0,1009 * X - 0,00169; R^2 = 0,9999$$

pri čemu su:

Y – absorbanca uzorka (584 nm),

X – koncentracija boje KV (mg/ml).

1.2. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet u ISP1 podlozi



Slika P-1.2. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet u ISP1 podlozi

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

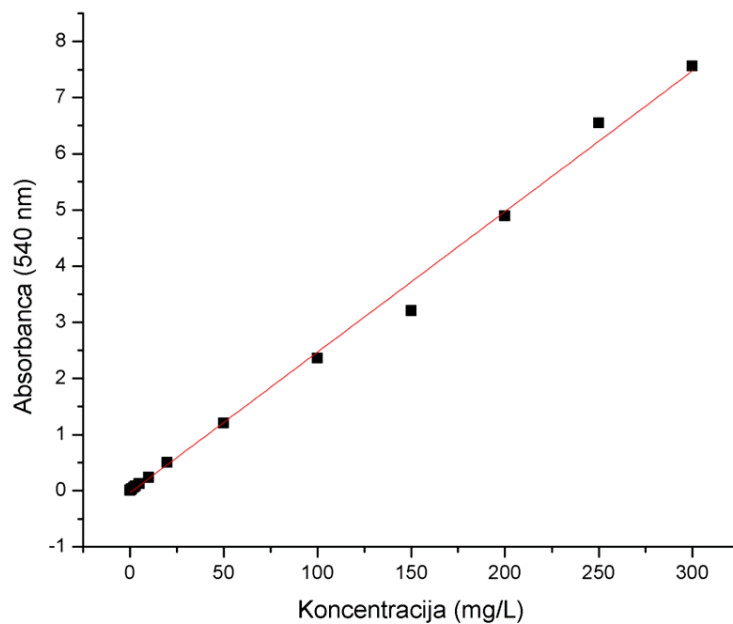
$$Y = 0,1235 * X + 0,0123; R^2 = 0,9995$$

pri čemu su:

Y – absorbanca uzorka (584 nm),

X – koncentracija boje KV (mg/ml).

1.3. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje safranin T u ISP1 podlozi



Slika P-1.3. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje safranin T u ISP1 podlozi

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

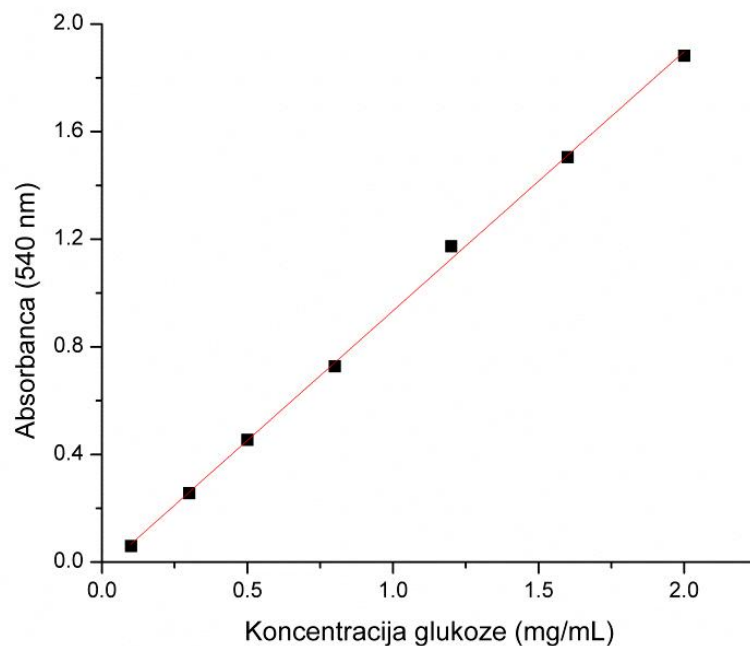
$$Y = 0,02505 * X - 0,03547; R^2 = 0,9952$$

pri čemu su:

Y – absorbanca uzorka (540 nm),

X – koncentracija boje ST (mg/ml).

1.4. Standardna kriva za određivanje koncentracije redukujućih šećera



Slika P-1.4. Standardna kriva za određivanje sadržaja glukoze

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

$$Y = 0,9636 * X - 0,0292; R^2 = 0,9988$$

pri čemu su:

Y – absorbanca uzorka (540 nm),

X – koncentracija glukoze (mg/ml).

PRILOG 2

RSM MATRICE DIZAJNA

Tabela P-2.1. Matrica BBD i njegovi odzivi adsorpcije boje kristal violet na neaktivirane/aktivirane repine rezance

Broj uзорaka	Faktori				Odzivi			
	A (g/l)	B (g/l)	C (s)	D	Y_{1N} (mg/g)	Y_{1A} (mg/g)	Y_{2N} (%)	Y_{2A} (%)
1	0,05	5	315	6	4,974	4,056	80,378	54,732
2	0,25	5	315	6	1,088	5,018	95,315	68,651
3	0,05	25	315	6	21,902	28,863	68,395	66,968
4	0,25	25	315	6	5,124	5,101	84,475	81,567
5	0,15	15	30	3	10,050	4,068	65,067	40,139
6	0,15	15	600	3	16,127	8,437	85,891	83,235
7	0,15	15	30	9	11,663	4,136	65,345	43,563
8	0,15	15	600	9	8,216	7,452	83,969	78,492
9	0,05	15	315	3	21,950	17,454	72,189	57,401
10	0,25	15	315	3	5,157	3,645	84,804	81,303
11	0,05	15	315	9	13,558	14,353	62,703	50,394
12	0,25	15	315	9	8,008	4,732	84,356	83,067
13	0,15	5	30	6	1,994	1,336	77,295	54,088
14	0,15	25	30	6	11,232	6,809	66,794	41,135
15	0,15	5	600	6	2,527	2,004	97,923	81,133
16	0,15	25	600	6	14,316	16,004	85,129	84,597
17	0,05	15	30	6	15,399	12,205	51,354	40,704
18	0,25	15	30	6	7,864	3,267	68,676	54,476
19	0,05	15	600	6	21,263	19,969	74,246	66,595
20	0,25	15	600	6	5,235	5,146	87,283	85,814
21	0,15	5	315	3	2,044	1,530	89,752	63,999
22	0,15	25	315	3	14,527	11,165	81,144	72,687
23	0,15	5	315	9	2,319	1,055	93,405	69,139
24	0,15	25	315	9	10,066	13,117	76,477	78,255
25	0,15	15	315	6	8,4121	7,3659	84,162	73,695
26	0,15	15	315	6	8,296	7,311	82,999	73,144
27	0,15	15	315	6	8,192	7,011	81,958	70,145
28	0,15	15	315	6	8,149	7,935	81,530	79,387
29	0,15	15	315	6	7,788	6,974	77,918	69,778

Y_{1N}/Y_{1A} : Adsorpcioni kapacitet na neaktivirane/aktivirane repine rezance;

Y_{2N}/Y_{2A} : Procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim repinim rezancima;

A: Količina adsorbenta;

B: Početna koncentracija boje;

C: Vreme trajanja procesa;

D: Početna pH rastvora boje.

Tabela P-2.2. Matrica CCD i njegovi odzivi adsorpcije boje kristal violet neaktiviranom/aktiviranom zeolitu

Broj uzoraka	Procesne promenljive			Odzivi			
	A (g/l)	B (g/l)	C (s)	Y_{1N} (mg/g)	Y_{1A} (mg/g)	Y_{2N} (%)	Y_{2A} (%)
1	5	0,250	1200	3,111	24,321	43,642	40,641
2	5	0,050	120	2,057	18,592	35,922	65,922
3	12,5	0,150	600	9,741	9,283	77,359	77,359
4	12,5	0,150	1200	9,440	8,982	78,851	74,851
5	20	0,250	600	11,331	11,465	93,723	91,723
6	5	0,050	1200	3,040	9,896	40,962	48,963
7	20	0,050	1200	2,252	2,252	42,076	90,075
8	20	0,250	1200	11,285	10,999	88,994	87,994
9	1,9	0,150	1200	1,584	28,247	26,913	40,913
10	1,9	0,150	600	1,294	32,432	21,080	51,080
11	23,1	0,150	1200	6,200	6,200	62,474	95,474
12	12,5	8,579	600	0,431	0,431	38,810	82,805
13	12,5	0,150	1200	10,916	10,916	76,965	76,965
14	12,5	0,291	120	9,858	19,657	74,315	84,316
15	12,5	0,009	1200	1,503	0,503	41,287	73,287
16	20	0,050	120	2,250	2,250	40,984	89,983
17	12,5	0,009	120	0,615	0,615	38,545	89,544
18	12,5	0,150	120	10,159	9,702	73,847	80,846
19	12,5	0,291	600	11,305	15,274	85,516	75,516
20	20	0,050	600	2,490	2,490	43,818	99,619
21	12,5	0,150	120	10,093	8,901	74,178	79,178
22	5	0,250	600	6,451	29,167	41,334	58,334
23	12,5	0,150	600	10,798	10,265	79,545	85,545
24	5	0,250	120	5,072	33,297	35,294	66,594
25	23,1	0,150	120	5,744	5,447	58,887	84,887
26	1,9	0,150	120	0,955	34,085	20,545	55,545
27	5	0,050	600	2,473	12,973	33,726	69,726
28	20	0,250	120	11,844	11,844	87,756	90,755
29	12,5	0,291	1200	9,462	16,346	82,114	70,114
30	23,1	0,150	600	6,424	6,424	66,931	98,931

Y_{1N}/Y_{1A} : Adsorpcioni kapacitet neaktiviranog/aktiviranog zeolita;

Y_{2N}/Y_{2A} : Procenat uklanjanja boje neaktiviranim/aktiviranim zeolitom;

A: Količina adsorbenta;

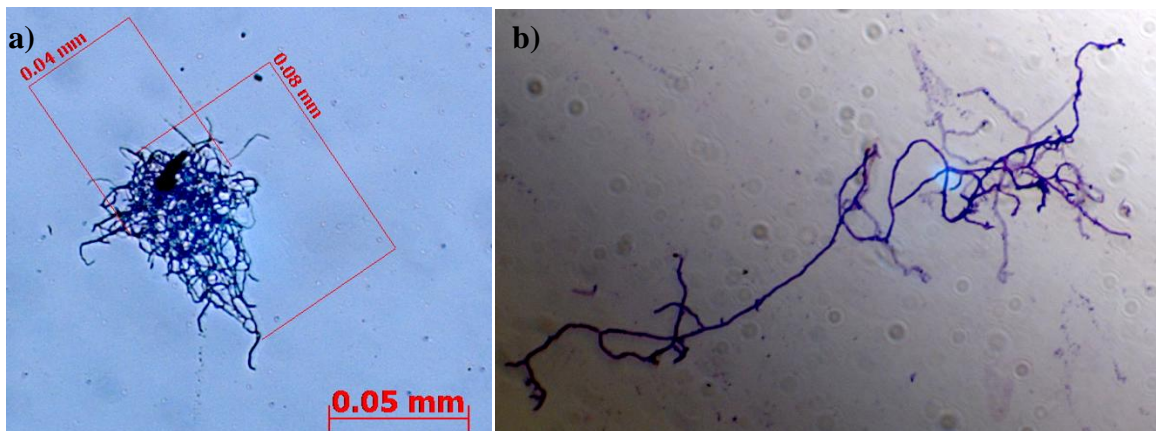
B: Početna koncentracija boje;

C: Vreme trajanja procesa;

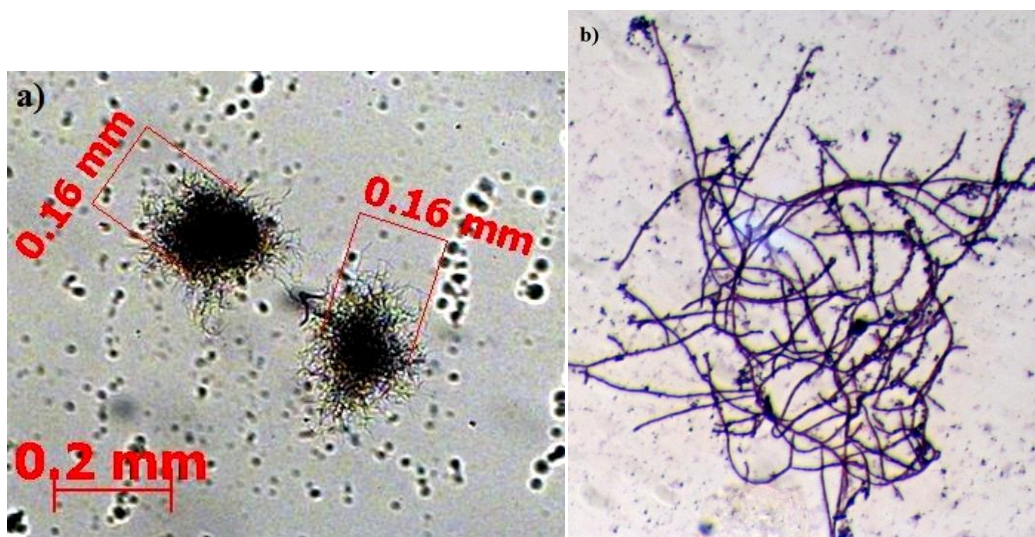
D: Početna pH rastvora boje.

PRILOG 3

NATIVNI I FIKSIRANI MIKROSKOPSKI PREPARATI



Slika P-3.1. Nativni, uvećanje 300x (a) i fiksirani, uvećanje 1500x, preparat *Streptomyces fulvissimus* CKS7.



Slika P-3.2. Nativni, uvećanje 300x (a) i fiksirani, uvećanje 1500x preparat *Streptomyces microflavus* CKS6.

PRILOG 4

SPISAK TERMINA I DEFINICIJE POJMOVA KORIŠĆENIH U DISERTACIJI

- **Repini rezanci** - agroindustrijski nus-proizvod, čvrst ostatak zaostao nakon proizvodnje šećera obradom šećerne repe ili otpadni repini rezanci.
- **Otpadna kafa** - talog od kafe ili osušeni čvrsti ostaci koji zaostaju nakon pripreme napitaka u industrijskim uslovima.
- **Obojene otpadne vode** - industrijske otpadne vode koje sadrže boju.
- **Neaktivirani repini rezanci** - adsorbent nastao mlevenjem komercijalno dostupnih suvih repinih rezanaca.
- **Aktivirani repini rezanci** - adsorbent nastao aktiviranjem neaktiviranih repinih rezanaca pomoću mikrotalasa.
- **Neaktiviran zeolit** - adsorbent nastao mlevenjem prirodnog minerala zeolita.
- **Aktiviran zeolit** - adsorbent nastao aktiviranjem neaktiviranog zeolita pomoću mikrotalasa.
- **Nosač otpadna kafa** - nastaje nakon ekstrakcije polifenola iz čvrstih ostataka koji zaostaju nakon pripreme napitaka.
- **Nosač otpadna kafa-GIA** - nastaje modifikacijom nosača otpadna kafa gluter aldehidom.
- **Nosač otpadna kafa-ClO₂** - nastaje modifikacijom nosača otpadna kafa hlor dioksidom.
- **Nosač otpadna kafa-H₂O₂** - nastaje modifikacijom nosača otpadna kafa vodonik peroksidom.

PRILOG 5**SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U DISERTACIJI**

- **ANOVA** - analiza varijanse
- **β -G** - β -D-glukozidaze
- **BBD** - Boks-Benken dizajn (*Box–Behnken Design*)
- **BPK** - biohemijska potrošnja kiseonika
- **CBH**- celobiohidrolaze
- **CCD** - centralni kompozitni dizajn (*Central Composite Design*)
- **CKS1** - *Paenibacillus chitinolyticus* CKS 1
- **CKS6** - *Streptomyces microflavus* CKS 6
- **CKS7** - *Streptomyces fulvissimus* CKS 7
- **C.I.** - kolor indeksa (*Colour Index*)
- **EC broj** - enzimski broj (*Enzyme commission number*)
- **EG** - endocelulaze
- **EGZ** - egzocelulaze
- **EI** - efikasnost imobilizacije (%)
- **FTIR**- Furierova (*Fourier*) transformacija infracrvenog zračenja (*Fourier Transform Infrared Radiation*)
- **GIA** - gluter aldehyd
- **HPK** - hemijska potrošnja kiseonika
- **ISP1**- tečna podloga za gajenje mikroorganizama
- **IUBMB** - međunarodna unija za biohemiju i molekularnu biologiju (*International union of biotechnology and molecular biology*)
- **KAU** - komercijalni aktivni ugalj
- **KV** - kristal violet
- **LiP** - lignin-peroksidaze
- **MnP** - mangan-peroksidaze
- **pH_{pzc}** - pH vrednost nultog naelektrisanja (*Point of Zero Charge*)
- **PI** - prinos imobilizacije (%)

- **RIKS** - relativnoi indeks klijanja semena
- **RSM** - metoda odzivne površine (*Response Surface Methodology*)
- **SEM** - skenirajući elektronski mikroskop
- **SKG** - suma kvadratnih grešaka
- **ST** - safranin T

PRILOG 6

IZJAVE

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бунтић Анета
број индекса 4002/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ПРИМЕНА АГРОИНДУСТРИЈСКОГ ОТПАДА ЗА ИЗДВАЈАЊЕ КАТЈОНСКИХ БОЈА И
БИОЛОШКИХ МОЛЕКУЛА ИЗ ВОДЕНОГ РАСТВОРА ПРОЦЕСОМ БИОСОРПЦИЈЕ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 08.04.2017. год

Анета

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**Име и презиме аутора АНЕТА БУНТИЋБрој индекса 4002/2011Студијски програм ИНЖИЊЕРСТВО ЗАШТИТА ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕНаслов рада ПРИМЕНА АГРОИНДУСТРИЈСКОГ ОТПАДА ЗА ИЗДВАЈАЊЕ КАТЈОНСКИХ БОЈА И БИОЛОШКИХ
МОЛЕКУЛА ИЗ ВОДЕНОГ РАСТВОРА ПРОЦЕСОМ БИОСОРПЦИЈЕМентор Др СУЗАНА ДИМИТРИЈЕВИЋ-БРАНКОВИЋ, РЕДОВНИ ПРОФЕСОР ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРГИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА, УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУПотписани/а БУНТИЋ АНЕТА

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 08.04.2017.godАнеца

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ПРИМЕНА АГРОИНДУСТРИЈСКОГ ОТПАДА ЗА ИЗДВАЈАЊЕ КАТЈОНСКИХ БОЈА И
БИОЛОШКИХ МОЛЕКУЛА ИЗ ВОДЕНОГ РАСТВОРА ПРОЦЕСОМ БИОСОРПЦИЈЕ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 08.04.2017. год

Анеја