



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
BIOTEHNOLOGIJA



MODEL BIOPROCESA PROIZVODNJE ETANOLA IZ MEĐU- I NUSPROIZVODA PRERADE ŠEĆERNE REPE

doktorska disertacija

Mentor:
Prof. dr Siniša Dodić

Kandidat:
Damjan Vučurović, dipl. inž.

Novi Sad
2015

SADRŽAJ

Spisak tabela

Spisak slika

1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	5
3.1. Proizvodnja etanola	6
3.1.1. Proizvodnja etanola u SAD	6
3.1.2. Proizvodnja etanola u Brazilu	7
3.1.3. Proizvodnja celuloznog etanola	8
3.1.4. Postrojenja za proizvodnju celuloznog etanola	8
3.2. Proizvodnja etanola prve generacije: sirovine, proces i ograničenja	10
3.2.1. Predtretman	10
3.2.2. Fermentacija	11
3.2.3. Destilacija	11
3.3. Proizvodnja etanola druge generacije	12
3.3.1. Karakteristike lignocelulozne strukture	12
3.3.2. Koraci u procesu proizvodnje	13
3.3.2.1. Mehaničko usitnjavanje lignoceluloznog materijala	14
3.3.2.2. Fizičko-hemijski predtretman	15
3.3.2.3. Hidroliza	16
3.4. Među- i nus proizvodi prerade šećerne repe	20
3.4.1. Tehnološki postupak prerade šećerne repe	20
3.4.1.1. Ekstrakcioni sok	22
3.4.1.2. Retki sok	22
3.4.1.3. Gusti sok	22
3.4.1.4. Melasa	22
3.4.1.5. Izluženi repini rezanci	23
3.5. Modelovanje i simulacija u procesu projektovanja	24
3.5.1. Koraci projektovanja i učesnici	25
3.5.2. Modelovanje i simulacija	28
3.5.2.1. Šema bioprocesa	29
3.5.2.2. Koraci modelovanja	30
3.5.2.3. Modelovanje pomoću simulatora bioprocesa	32
3.5.2.4. Analiza nesigurnosti	34

4. MATERIJAL I METODE RADA	37
4.1. Priprema sirovina i definisanje uslova bioprocasa	38
4.1.1. Proizvodni mikroorganizmi	38
4.1.2. Hranljive podloge i njihova priprema	38
4.1.3. Uslovi fermentacije	39
4.2. Analitički postupci	41
4.2.1. Analiza kvaliteta sirovina	41
4.2.2. Analiza uzoraka fermentacione tečnosti	42
4.2.3. Statistička obrada podataka	43
4.2.4. Kinetički modeli i proračun kinetičkih parametara	44
4.2.5. Generisanje modela i simulacija bioprocasa	45
5. REZULTATI I DISKUSIJA	46
5.1. Sastav sirovina	47
5.2. Optimizacija predtretmana izluženih repinih rezanaca	49
5.3. Ispitivanje proizvodnje enzima	58
5.3.1. Proizvodnja enzima na različitim supstratima	58
5.3.2. Ispitivanje toka kultivacije plesni na izluženim repinim rezancima	62
5.4. Kinetika fermentacije među- i nusproizvoda prerade šećerne repe	66
5.4.1. Kinetika fermentacije ekstrakcionog soka	66
5.4.2. Kinetika fermentacije retkog soka	69
5.4.3. Kinetika fermentacije gustog soka	72
5.4.4. Kinetika fermentacije melase	75
5.4.5. Kinetika fermentacije izluženih repinih rezanaca	78
5.5. Model bioprocasa proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe	81
5.5.1. Potencijal Srbije za proizvodnju etanola	81
5.5.2. Model proizvodnje etanola iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe	82
5.5.2.1. Opis bioprocasa	82
5.5.2.2. Procesni parametri	84
5.5.2.3. Analiza bioprocasa	86
5.5.2.4. Ekonomska analiza	86
5.5.2.5. Analiza nesigurnosti	89
5.5.3. Model proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca	91
5.5.3.1. Maseni i energetske bilansi	93
6. ZAKLJUČAK	97
7. LITERATURA	100
8. PRILOZI	106

Spisak tabela

Tabela 3.1. Svetska proizvodnja etanola u 2008. godini	7
Tabela 3.2. Poređenje sirovina za proizvodnju etanola (Lynd i sar., 2009)	9
Tabela 3.3. Poređenje procesa enzimske i kiselinske hidrolize celuloznih materijala	19
Tabela 3.4. Mogući izvori podataka i problemi koji se obično javljaju	31
Tabela 5.1. Prosečan sastav svežih i suvih izluženih repinih rezanaca iz domaćih fabrika šećera	48
Tabela 5.2. Prosečan sastav međuproizvoda fabrike šećera i melase kao nusproizvoda	49
Tabela 5.3. Koficijenti regresione jednačine modelovanih odziva za predtretman izluženih repinih rezanaca	50
Tabela 5.4. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za predtretman izluženih repinih rezanaca	51
Tabela 5.5. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara nastanka etanola tokom fermentacije ekstrakcionog soka	68
Tabela 5.6. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara rasta biomase tokom fermentacije retkog soka	70
Tabela 5.7. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara nastanka etanola tokom fermentacije gustog soka	74
Tabela 5.8. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara rasta biomase tokom fermentacije melase	76
Tabela 5.9. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara nastanka etanola tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca	80
Tabela 5.10. Ekonomska analiza predloženog modela bioprocasa iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe	87
Tabela 5.11. Ekonomski indeksi projekta proizvodnje etanola	90

Tabela 5.12. Reakcije predtretmana i odgovarajući stepeni konverzije	94
Tabela 5.13. Reakcije hidrolize i odgovarajući stepeni konverzije	95
Tabela 5.14. Ekonomski parametri za model proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca	96

Spisak slika

Slika 3.1. Struktura lignoceluloze	13
Slika 3.2. Inhibicija celulaza: pregled glavnih kinetičkih puteva i interakcija koje se javljaju kod inhibicije proizvodom: (a) glavne reakcije (1,2), (b) inhibicija glukozom (3,4), (c) inhibicija celobiozom (5), (d) inhibicija supstratom (6,7), (e) transglikolizacija (8,9)	17
Slika 3.3. Tehnološki postupak prerade šećerne repe	21
Slika 3.4. Koraci u projektovanju bioprocesa, od ideje o nekom proizvodu do proizvodnog postrojenja (DTP – dijagram toka procesa)	25
Slika 3.5. Učesnici projektovanja i njihove interakcije tokom razvoja bioprocesa	28
Slika 3.6. Uloga modelovanja i simulacije u proširenju baze podataka za donošenje odluka u procesu projektovanja	29
Slika 3.7. Šema i celine bioprocesa	29
Slika 3.8. Koraci modelovanja i procene bioprocesa	31
Slika 3.9. Koraci rešavanja modela u softveru za simulaciju bioprocesa	33
Slika 3.10. Oblasti nesigurnosti koje utiču na bioprocес	35
Slika 4.1. Laboratorijski bioreaktor BIOSTAT A-Plus	40
Slika 4.2. Laboratorijski bioreaktor Chemap AG	40
Slika 4.3. Laboratorijski <i>solid state</i> bioreaktor	41
Slika 5.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti ukupnog sadržaja šećera tokom predtretmana izluženih repinih reznaca i vrednosti predviđenih modelom	51
Slika 5.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti sadržaja etanola tokom predtretmana izluženih repinih reznaca i vrednosti predviđenih modelom	51

Slika 5.3. Grafik standardizovanih efekata na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca	52
Slika 5.4. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine 180-850 µm	53
Slika 5.5. Grafik standardizovanih efekata na sadržaj etanola	53
Slika 5.6. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola pri predtretmanu izluženih repinih rezanaca veličine 180-850 µm	54
Slika 5.7. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine <180 µm	55
Slika 5.8. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola pri predtretmanu izluženih repinih rezanaca veličine <180 µm	55
Slika 5.9. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine >850 µm	56
Slika 5.10. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola pri predtretmanu izluženih repinih rezanaca veličine >850 µm	57
Slika 5.11. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od veličine čestica, koncentracije sumporne kiseline i trajanja predtretmana izluženih repinih rezanaca	58
Slika 5.12. Sadržaj redukujućih šećera u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima	59
Slika 5.13. Aktivnost amilaza u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima	60
Slika 5.14. Aktivnost celulaza u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima	61
Slika 5.15. Aktivnost ksilanaza u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima	61
Slika 5.16. Ukupan sadržaj proteina u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima	62

Slika 5.17. Sadržaj redukujućih materija u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca	63
Slika 5.18. Aktivnost amilaza u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca	63
Slika 5.19. Aktivnost celulaza u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca	64
Slika 5.20. Aktivnost ksilanaza u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca	65
Slika 5.21. Ukupan sadržaj proteina u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca	65
Slika 5.22. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije ekstrakcionog soka	66
Slika 5.23. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije ekstrakcionog soka	67
Slika 5.24. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije ekstrakcionog soka	68
Slika 5.25. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije retkog soka	69
Slika 5.26. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije retkog soka	70
Slika 5.27. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije retkog soka	71
Slika 5.28. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije gustog soka	72
Slika 5.29. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije gustog soka	73
Slika 5.30. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije gustog soka	74
Slika 5.31. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije melase	75
Slika 5.32. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije melase	76
Slika 5.33. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije melase	77

Slika 5.34. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca	78
Slika 5.35. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca	79
Slika 5.36. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca	80
Slika 5.37. Pojednostavljen dijagram toka proizvodnje etanola iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe	83
Slika 5.38. Glavne komponente troškova proizvodnje etanola	89
Slika 5.39. Uticaj cene šećerne repe i kvasca na troškove proizvodnje etanola	90
Slika 5.40. Uticaj recirkulacije biomase na ekonomske parametre procesa	91
Slika 5.41. Dijagram toka predloženog modela proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca	92
Slika 8.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije ekstrakcionog soka	107
Slika 8.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (C), etanola (B) i supstrata (A) tokom fermentacije retkog soka	108
Slika 8.3. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije gustog soka	109
Slika 8.4. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije melase	110
Slika 8.5. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca	111

1. UVOD

Tehnologija etanola predstavlja značajnu naučnu disciplinu s obzirom na veliku upotrebnu vrednost i široku zastupljenost njenih glavnih i sporednih proizvoda. Etanol kao glavni proizvod ima primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji, kao i u drugim industrijskim granama gde se upotrebljava kao rastvarač, aditiv ili polazna sirovina za različite tehnološke procese. Etanol proizveden fermentacijom biomase predstavlja moderan vid energije i značajnu zamenu tečnim fosilnim gorivima ili, u smeši sa gasovima, zamenu prirodnom gasu. Činjenica da je etanol obnovljiv i ekološki prihvatljiv izvor energije, dovela je do značajnog povećanja njegovih proizvodnih kapaciteta.

Trenutno se u svetu najviše etanola proizvodi iz šećernih i škrobnih sirovina, dok je proizvodnja etanola iz lignoceluloznih sirovina još u začetku. Jeftinija proizvodnja šećera iz šećerne trske ukazuje na veliki potencijal primene šećerne repe za proizvodnju etanola. Takođe, povećanje prinosa i efikasnosti proizvodnje šećera je dovela do smanjene potražnje za šećernom repom. Iz ovih razloga većina postojećih fabrika šećera u Evropi je otpočela simultanu proizvodnju etanola ili se potpuno preorijentisala na ovu tehnologiju. Naša zemlja predstavlja region sa velikim potencijalom za proizvodnju energije iz obnovljivih izvora, naročito iz biomase.

Kao sirovina za dobijanje etanola u našem regionu se do sada najviše primenjivala melasa. Melasa, kao nusproizvod prerade šećerne repe, se dobija na kraju ovog procesa i u skladu sa tim troškovi njenog dobijanja su značajno veći u poređenju sa troškovima dobijanja međuproizvoda kao što su ekstrakcioni, retki i gusti sok. Pored toga, jedan od nusproizvoda prerade šećerne repe su izluženi repini rezanci, koji se samostalno ili u kombinaciji sa međuproizvodima ove industrije mogu upotrebiti za proizvodnju etanola.

S obzirom da je proces proizvodnje etanola iz međuproizvoda industrije šećera poznat, a iz izluženih repinih rezanaca kao lignocelulozne sirovine nedovoljno ispitan, javila se potreba za određivanjem optimalnih procesnih parametara i definisanjem kinetike dobijanja etanola fermentacijom izluženih repinih rezanaca, sa krajnjim ciljem projektovanja modela bioprocasa za proizvodnju etanola iz datog nus- i/ili međuproizvoda prerade šećerne repe.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Svojim sastavom izluženi repini rezanci predstavljaju veoma atraktivnu sirovinu za proizvodnju etanola. Sa druge strane, dosadašnja upotreba ovog nusproizvoda prerade šećerne repe je bila samo kao hrana za stoku. Stoga se postavlja pitanje mogućnosti dobijanja veće ekonomske i ekološke dobiti primenom date sirovine za proizvodnju nekog visoko vrednog proizvoda, kao što je etanol, uz valorizaciju ostalih izlaznih tokova procesa sa ciljem postizanja koncepta čistije proizvodnje, odnosno koncepta nulte emisije. Upravo simulacioni modeli postrojenja predstavljaju pomoćnu alatku za izvođenje ekonomske analize i drugih proračuna vezanih za bioproces, a bitnih za projektovanje. Za potrebe generisanja ovakvih modela, a kasnije i kontrolu samog bioprocesa, nužno je poznavati kinetiku i kinetičke parametre vezane za dati proces. Utvrđivanje ovih kinetičkih jednačina ima smisla samo kada se bioproces izvodi pod optimalnim uslovima. Da bi se proces optimizovao neophodno je detaljno proučavanje proizvodnje etanola fermentacijom nus- i međuproizvoda prerade šećerne repe i njegovo poređenje sa fermentacijom tradicionalno primenjivane melase iz domaćih fabrika šećera.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatiće optimizaciju, kinetičko modelovanje i simulaciju dobijanja etanola fermentacijom izluženih repinih rezanaca ili namešavanjem njihovih hidrolizata sa ekstrakcionim, retkim i gustim sokom primenom metode odzivne površine, različitih kinetičkih modela i programa SuperPro Designer, redosledom.

Optimizacija procesa će doprineti razumevanju različitih operativnih uslova, kao i međusobnih interakcija ovih varijabli na predtretman, hidrolizu i fermentaciju date biomase. Izvođenjem procesa pod optimalnim uslovima definisaće kinetiku proizvodnog procesa, a dobijeni kinetički modeli će omogućiti projektovanje čitavog bioprocesa kroz simulaciju. Krajnji model bioprocesa će olakšati definisanje materijalnih i energetskih bilansa, dimenzionisanje opreme, pravljenje plana proizvodnje, analizu produktivnosti i uklanjanje „uskih grla“, analizu troškova, ekonomske isplativosti i kapaciteta proizvodnje, sprečavanje zagađenja i njenu kontrolu, itd.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Proizvodnja etanola

Progresivno iscrpljivanje fosilnih izvora ugljenika izaziva sve veću zabrinutost u pogledu njihove dostupnosti kao i u pogledu efekta staklene bašte (GHG – *Greenhouse Gas*) i globalnog zagrevanja. Biogoriva mogu imati ključnu ulogu u rešavanju ovih problema (Faaij, 2006). U poslednjih nekoliko godina najvažnija komercijalna rešenja predstavljaju etanol dobijen iz kukuruznog skroba u SAD, etanol proizveden iz šećerne trske u Brazilu i biodizel dobijen uglavnom iz ulja uljane repice u Nemačkoj i Francuskoj (Sagar i Kartha, 2007). Etanol je prepoznat kao potencijalna alternativa naftnim derivatima, odnosno transportnim gorivima (Oliveria i sar., 2005), uz nekoliko prednosti poput visokog oktanskog broja, niskog cetanskog broja i visoke toplote isparavanja (Balat, 2007).

Mogućnost proizvodnje etanola ispitana je na različitim sirovinama (biomasa). Prema Balat i sar. (2008) sirovine za etanol mogu se svrstati u tri grupe: (i) lignocelulozni materijali poput drvene biomase, (jednogodišnjih) zeljastih biljaka i različiti otpad; (ii) žitarice bogate skrobom kao što su kukuruz i sirak; (iii) usevi bogati saharozom poput šećerne trske i šećerne repe.

U 2009. godini globalna proizvodnja etanola dostigla je 72 milijarde litara (agra-net.com, 2010) što čini više od 94% svetske proizvodnje biogoriva (International Risk Governance Council, 2007). Brazil i SAD predstavljaju svetske lidere i zajedno čine oko 90% svetske proizvodnje etanola (tabela 3.1).

3.1.1. Proizvodnja etanola u SAD

U SAD tokom 2010. godine proizvedeno je 45,8 milijardi litara etanola (Service, 2010). U toj godini 204 biorafinerije su bile u funkciji a 7 je bilo u izgradnji (RFA – *Renewable Fuels Association*, <http://www.ethanolfra.org/biorefinery-locations/>, pristup 22. novembra 2010.). Etanol se u mnogim državama SAD trenutno koristi kao aditiv za benzin, gde je u velikoj meri zamenio metil tercijarni butil etar (aditiv za benzin) u poslednjih 6 godina i oksigenate kako bi se smanjilo zagađenje vazduha (Solomon, 2010).

Više od 95% proizvedenog etanola za upotrebu u automobilima se trenutno proizvodi iz kukuruznog skroba i uglavnom se koristi kao 10% smeša sa benzinom (E10). Sva motorna vozila proizvedena u SAD nakon 1988. godine rade na smešu etanola E10, a u većini slučajeva i E20 (20 % smeša sa benzinom). Trenutno, više od sedam miliona vozila u SAD-u ima motore koji mogu da koriste 85% smešu etanola i benzina (E85; U.S. Department of Energy, 2008).

Tabela 3.1. Svetska proizvodnja etanola u 2008. godini

Država	Milioni litara
SAD	34068,7
Brazil	24500,0
Evropska Unija	2774,7
Kina	1896,5
Kanada	897,2
Ostali	484,5
Tajland	336,9
Kolumbija	299,0
Indija	250,0
Australija	98,4
Ukupno	62801,2

3.1.2. Proizvodnja etanola u Brazilu

U Brazilu etanol se proizvodi isključivo iz šećerne trske. Sa prosečnom produktivnošću od oko 6000 L/ha (Soccol i sar., 2010) brazilski agroenergetski sistem šećerne trske predstavlja najefikasniji sistem (Goldemberg, 2007). U 2008. godini proizvodnja etanola je dostigla oko 22,7 milijardi galona (Soccol i sar., 2010) a broj postrojenja u funkciji je procenjen na 448 (Udop, 2009). Trenutno, u Brazilu više od 80% vozila radi na bioetanol, čak su i mali avionski motori u razvoju (Soccol i sar., 2010).

Šećerna trska je odabrana kao supstrat za proizvodnju etanola zbog svoje odlične adaptacije na brazilsko zemljište i vremenske uslove. Troškovi proizvodnje etanola iz šećerne trske iznose od 0,25-0,30 \$/L (Cerqueria Leite i sar., 2009) i oko 70% ovih troškova je posledica troškova nabavke sirovine (IBGE, 2008). Trenutno se sa jedne strane radi na povećanju prinosa šećerne trske, dok se sa druge strane radi na povećanju frakcije biomase koja se prevodi u etanol (Soccol i sar., 2010). Deo biomase šećerne trske koji se koristi za proizvodnju bioenergije odgovara jednoj trećini biljke, druga trećina koju predstavljaju otpaci nakon prerade šećerne trske se spaljuje radi proizvodnje električne energije, dok preostala trećina ostaje na obradivom zemljištu (Cortez i sar., 2008). Značajno povećanje prinosa proizvodnje etanola bi bilo moguće jedino razvojem tehnologija za proizvodnju etanola iz otpadaka nakon prerade šećerne repe, čiji je potencijal proizvodnje 2270 miliona litara etanola iz 10 miliona tona suve biomase (Soccol i sar., 2010).

3.1.3. Proizvodnja celuloznog etanola

Upotreba šećera ili skroba kao sirovine za proizvodnju biogoriva nadmeće se sa njihovom upotrebom u ishrani (Pimentel i sar., 2008), a i ne očekuje se da će se moći postići količine neophodne za podmirivanje sve veće potrebe za etanolom kao gorivom. Lignocelulozna biomasa predstavlja atraktivnu alternativnu sirovinu za proizvodnju etanola kao goriva. Lignoceluloza je najzastupljeniji obnovljivi izvor na Zemlji i ona predstavlja veliku komponentu u gradskim, poljoprivrednim, šumskim i nekim industrijskim otpadima. Geografski veća rasprostranjenost lignoceluloznih izvora u odnosu na fosilne rezerve može da obezbedi sigurnost u snabdevanju korišćenjem domaćih izvora energije (Lee i Shah, 2013). Upotreba lignoceluloznih materijala bi smanjila razdor između primene zemljišta za uzgoj hrane i energetskih sirovina (biljaka). Ova sirovina je jeftinija u odnosu na konvencionalne poljoprivredne sirovine i ona se može proizvesti sa manjom upotrebom đubriva, pesticida i energije. Biogoriva dobijena iz lignoceluloze generišu niže neto vrednosti emisije gasova staklene bašte, smanjujući na taj način uticaj na životnu sredinu i klimatske promene.

Smanjenje cene etanola uglavnom zavisi od kupovne cene sirovine i troškova obrade sirovine. Pri sadašnjim cenama za kukuruz, šećernu trsku i celuloznu biomasu, poslednja sirovina je najjeftinija (Lynd i sar., 2009). Međutim, redosled na osnovu troškova konverzije primenom trenutno poznatih tehnologija je sasvim suprotan od onog za cenu sirovina: celulozna biomasa > kukuruz > šećerna trska. Uzimajući u obzir i cenu sirovine i trenutnu tehnologiju za konverziju, kratkoročna cena etanola je etanol iz šećerne trske < etanol iz kukuruznog skroba < celulozni etanol, dok je na duže staze, uključujući i napredne nove tehnologije (Lynd i sar., 2009), projektovana prodajna cena celuloznog etanola manja od kupovne cene ostalih razmatranih sirovina (Lynd i sar., 2009). Celulozna biomasa je na duže staze najbolji kandidat za proizvodnju energije u velikim razmerama od svih sirovina prikazanih u tabeli 2 i to zbog svog potencijala za niskim troškovima proizvodnje, mogućnosti proizvodnje u velikim razmerama i ekološke dobiti. Međutim, celulozna biogoriva se još uvek ne proizvode na konkurentnom nivou zbog visokih troškova prerade sa trenutno dostupnim tehnologijama (Lynd i sar., 2008).

3.1.4. Postrojenja za proizvodnju celuloznog etanola

Trenutno se u nekoliko država etanol proizvodi iz lignoceluloznih sirovina ali je proizvodnja u različitim nivoima razvoja, dok je paralelno u toku i nekoliko javnih/privatnih međunarodnih projekata u sektoru bioodrživosti sa ciljem unapređenja bioekonomije.

U Kanadi logen-ovo postrojenje proizvodi celulozni etanol od 2004. godine, a u 2009. godini postignuta je godišnja proizvodnja od oko 1500000 L etanola iz pšenične trske (slame) (<http://www.iogen.ca/>). Ovo postrojenje koje se nalazi u Otavi projektovano je za preradu 20-30 tona sirovine na dan (pšenične, ječmene ili ovsene stabljike) i proizvede približno 5000-6000 L celuloznog etanola za jedan dan.

Tabela 3.2. Poređenje sirovina za proizvodnju etanola (Lynd i sar., 2009)

		Vrsta sirovine		
		Celuloza	Skrob	Šećer
(A) Proizvodnja velikih razmera	Po jedinici	****	****	***
	Ukupno	****	**	**
(B) Ruralni ekonomski razvoj	Trenutno	**	****	****
	Budućnost	****	***	***
(C) Zamena benzina	Po jedinici	*****	*****	*****
	Ukupno	*****	***	***
(D) Zamena fosilnih goriva/smanjenje GHG	Po jedinici	*****	***	*****
	Ukupno	*****	**	****
(E) Plodnost zemljišta i poljoprivredna ekologija		*****	**	****
(F) Goriva niske cene (sirovine i konverzija)	Trenutno	**	***	***
	Budućnost	*****	***	***

Ocene: ***** Odličan; **** Vrlo dobar; *** Dobar; ** Dovoljan; * Slab.

Tokom leta 2005. godine, Sekab-ovo postrojenje u Ornskoldsviku (Švedska) počelo je sa proizvodnjom etanola iz piljevine (<http://www.sekab.com>). Trenutno, Sekab snabdeva 1400 E85 pumpi u čitavoj Švedskoj etanolom, a broj automobila prilagođenih na ovu vrstu goriva je oko 147000.

Ministarstvo energetike SAD i Abengoa Bioenergy su potpisali četvorogodišnji ugovor u vrednosti od 35,5 miliona dolara u 2003. godini za razvoj tehnologije biorafinerije, gde sirovinu predstavljaju smeše destilacione džibre i kukuruzovine. U skladu sa ovim ugovorom, Abengoa Bioenergy (<http://www.abengoabioenergy.com/corp/web/es/index.html>) razvija pilot postrojenje za integraciju procesa proizvodnje etanola iz lignocelulozne biomase sa proizvodnjom etanola iz žitarica, a sve sa ciljem postizanja ekonomičnosti datog procesa. Ovaj projekat podrazumeva konverziju skroba, celuloze i hemiceluloze (uglavnom kukuruzovine) do etanola. U prvoj fazi ovog projekta, kada je testirano pilot postrojenje, uspešno je izvedena konverzija skroba i poboljšana proizvodnja nusproizvoda. Pilot postrojenje koje prerađuje 1,5 t/dan i koje radi od septembra 2007 koristi se za optimizaciju procesa, sakupljanje inženjerski neophodnih podataka za prevođenje procesa u industrijske razmere (scale-up) i sakupljanje ogromnih količina različitih nusproizvoda za dalji razvoj procesa i njegovu evaluaciju.

Inbicon (<http://www.inbicon.com/pages/index.aspx>) postavlja biorafinerije za proizvodnju celuloznog etanola na različitim lokacijama. Kod Kalundborga (Danska), njihova biorafinerija može da proizvede 5,3 miliona L celuloznog etanola godišnje iz biomase poput izluženih repinih rezanaca, raznih trava i ostataka prerade voća. U Maleziji, oni planiraju projekte sa proizvodnjom od 19 i 38 miliona L godišnje. U SAD, njihovo prvo komercijalno postrojenje će proizvoditi 76 miliona L godišnje.

Poet (<http://www.poet.com>) poseduje mrežu od 27 postrojenja u nekoliko država SAD sa ukupnom proizvodnjom od preko 6 milijardi L godišnje. Uloženo je više od 40 miliona dolara na istraživanje za konstrukciju komercijalnog postrojenja za celulozni etanol (u Emetsburgu, Ajova) koje bi trebalo da dostigne proizvodni kapacitet od 94,6 miliona L godišnje upotrebom klipa kukuruza kao sirovine.

3.2. Proizvodnja etanola prve generacije: sirovine, proces i ograničenja

Biogoriva prve generacije su goriva proizvedena iz tradicionalnih poljoprivrednih kultura, uglavnom iz kukuruza, šećerne trske i šećerne repe. Šećerna trska i šećerna repa imaju najveći potencijal kao sirovine za proizvodnju bioetanola (United Nations Conference on Trade and Development, 2006) jer predstavljaju izvore saharoze, disaharida sastavljenog od glukoze i fruktoze povezanih β -1,2 vezom. Saharozu se hidrolizuje enzimom (invertaza) kog proizvode skoro sve vrste roda *Saccharomyces*, tako da nije potrebna predhidroliza supstrata. Ovo čini proizvodnju etanola iz šećera (saharoze) veoma isplativim procesom u poređenju sa proizvodnjom etanola iz kukuruza. Dve trećine svetske proizvodnje šećera je iz šećerne trske a jedna trećina je iz šećerne repe (Linoj i sar., 2006). Šećerna trska se gaji u tropskim i subtropskim regionima, dok se šećerna repa uzgaja samo u državama sa umerenom klimom.

Iako postoji ogroman broj skrobnih sirovina, samo nekolicina ima industrijski značaj: kukuruz, kasava, krompir i pšenica. Kukuruzni skrob, na primer, čini više od 80% svetskog tržišta skroba, a najveća proizvodnja je u SAD (Jobling, 2004). U tropskim zemljama, druge skrobne kulture poput lukovica (npr. kasava) mogu se upotrebiti za komercijalnu proizvodnju etanola kao goriva (Cardona i Sanchez, 2007). Za proizvodnju etanola iz skroba neophodno je razgraditi lance ovog ugljenog hidrata kako bi se dobio glukozni sirup, koji se može prevesti do etanola primenom *Saccharomyces cerevisiae*. Ova predhidroliza se obično izvodi primenom enzima koji hidrolizuju skrob i ona predstavlja dodatan trošak.

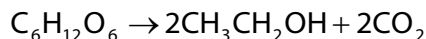
Proces proizvodnje etanola prve generacije obuhvata sledeće korake:

3.2.1. Predtretman

Predtretman sirovine zavisi od vrste sirovine koja je odabrana. Međutim, neke od procedura su uobičajene u većini slučajeva: pranje sa ciljem uklanjanja nečistoća, mlevenje sa ciljem smanjenja veličine; presovanje sa ciljem ekstrakcije soka i odvajanja čvrste frakcije, koja se obično naziva pulpa; fizičko-hemijski tretman dobijene tečnosti. Upotreba skrobnih sirovina neizbežno zahteva primenu hidrolize, koja može biti hemijska (kisela) hidroliza ili enzimaska hidroliza.

3.2.2. Fermentacija

Ovaj bioproces predstavlja konverziju fermentabilnih šećera (heksoza) do etanola pomoću metabolizma mikroorganizama, kao što je prikazano sledećom jednačinom:



Kada je supstrat saharoza fermentacija se obično izvodi pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, dok se bakterija *Zymomonas mobilis* može upotrebiti za prevođenje glukoze do etanola. Teorijski prinos je 0,511 g etanola/g heksoze. Međutim, usled nastajanja sporednih proizvoda poput glicerola i organskih kiselina i održavanja rasta proizvodnog mikroorganizma, stvarni maksimalni prinos je oko 0,485 g etanola/g heksoze, koji se još naziva *Pasteur-ov* prinos (Lima i Marcondes, 2002).

Tokom procesa fermentacije nekoliko fizičko-hemijskih faktora poput temperature, rastvorenog kiseonika, vrednosti pH i nutrijenata su veoma bitni za pravilan rast i razvoj proizvodnog mikroorganizma (Grahovac, 2011). Za *Saccharomyces cerevisiae* temperaturu treba održavati ispod 32 °C, idealna vrednost pH je između 4 i 5, a koncentracija šećera ne sme da bude veća od 25 %(m/v). Nakon podešavanja ovih parametara, fermentacija počinje i obično se izvodi u diskontinualnom režimu, kako bi se izbeglo prekomerno stvaranje gasova i pene. Sudovi za fermentaciju obično imaju interni ili eksterni sistem za regulaciju temperature. Nakon fermentacije ćelije se od fermentacione tečnosti odvajaju centrifugiranjem, tretiraju sumpornom kiselinom i nutrijentima kako bi im se poboljšala viabilnost i ponovo koriste kao inokulum za narednu fermentaciju.

3.2.3. Destilacija

Uređaj za destilaciju se sastoji od destilacione kolone, rebojlera, koji se nalazi pri dnu kolone, i kondenzatora, koji se nalazi pri vrhu kolone. Fermentaciona tečnost obično sadrži 7-7,5 %(v/v) etanola i uvodi se u prvu kolonu radi primarne separacije. Parna faza ove kolone sadrži 35-45 %(v/v) etanola i ona se uvodi u drugu kolonu radi primarne destilacije. Nakon toga, smeša se uvodi u treću kolonu (rektifikacionu kolonu) koja dovodi koncentraciju etanola do 95,6 %, odnosno maksimalno moguću koncentraciju azeotropne smeše etanol-voda. Bezvodni (anhidrovani) etanol, koji se obično dodaje u benzin, dobija se destilacijom u prisustvu rastvarača poput heksana ili benzena, ili pomoću molekulskih sita (Lima i Marcondes, 2002). Ostatak (otpad) nakon destilacije naziva se džibra i predstavlja ekološki problem s obzirom da proizvodnjom 1 L etanola nastaje 15 L džibre.

3.3. Proizvodnja etanola druge generacije

Biogoriva druge generacije su ona koja se proizvode iz neprehrambenih obnovljivih izvora. Neke vrste lignocelulozne biomase poput trske, ljuske kukuruza, stabljike kukuruza, rezanaca šećerne repe i organske frakcije čvrstog gradskog otpada predstavljaju izobilan, jeftin i dostupan izvor za proizvodnju etanola druge generacije (Yang, 2007). Trenutno, ova naširoko dostupna biomasa se smatra otpadom koji je zaostao na poljoprivrednom zemljištu i koji se spaljuje nakon žetve (Dawson i Boopathy, 2007) ili se spaljuje u nekom industrijskom postrojenju za dobijanje toplotne energije ili se koristi kao hrana za stoku.

3.3.1. Karakteristike lignocelulozne strukture

Lignoceluloza je glavna komponenta biomase, čineći oko polovine biljne materije nastale u procesu fotosinteze i predstavlja najrasprostranjeniju obnovljivu organsku sirovinu obradivog zemljišta. Ona se sastoji iz tri vrste polimera, celuloze, hemiceluloze i lignina, koji su čvrsto ispreplirani i hemijski vezani nekovalentnim i kovalentnim vezama (Perez i sar. 2002; Sanchez, 2009), kao što je prikazano na slici 3.1.

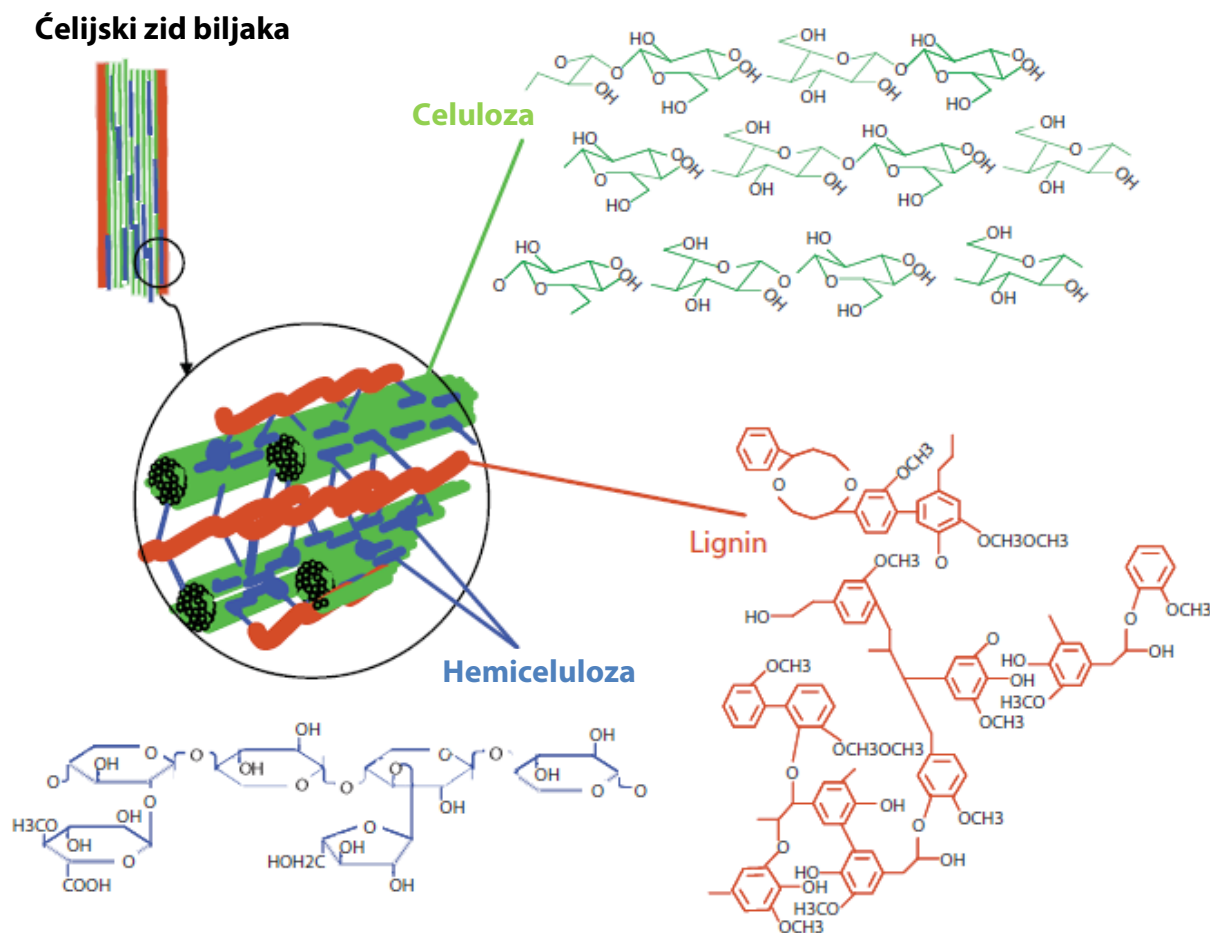
U poređenju sa skrobnom biomasom, ona se smatra poprilično "neposlušnim" materijalom zbog svoje kristalne strukture i prisustva lignina. Samo se mali deo celuloze, hemiceluloze i lignina proizvedenih kao nusproizvodi poljoprivrede ili šumarstva upotrebljava, dok se ostatak smatra otpadom.

Celuloza i hemiceluloza su makromolekuli sastavljeni od različitih šećera, dok je lignin aromatični polimer sačinjen od prekursora fenilpropanoide. Sastav i odnosi ovih jedinjenja zavisi od biljne vrste (Sanchez, 2009).

Celuloza je linearan polimer koji se sastoji od podjedinica celobioze (dimer D-glukoze povezane β -1,4-glikozidnim vezama). Ove podjedinice grade dugačke lance (elementarna vlakna) koja su međusobno povezana vodoničnim vezama i međumolekulskim van der Waals-ovim silama. Ovaj polimer je obično prisutan u kristalnoj formi, a mali deo neuređenih celuloznih lanaca čini amorfnu celulozu. U amorfnoj konformaciji celuloza je podložnija enzimskoj hidrolizi (Perez i sar., 2002). Celuloza se u prirodi javlja zajedno sa drugim jedinjenjima, uglavnom ligninom, što utiče na njenu biodegradaciju.

Hemiceluloza je polisaharid sa manjom molekulskom masom od celuloze. Ona se sastoji od D-ksiloze, D-manoze, D-galaktoze, D-glukoze, L-arabinoze, 4-O-metil-glukuronske, D-galakuronske i D-glukuronske kiseline, što uglavnom zavisi od izvora hemiceluloze. Ove jedinice su povezane β -1,4- i ponekad β -1,3-glikozidnim vezama.

Lignin je prisutan u ćelijskom zidu kako bi doprineo čvrstini strukture, nepropustljivosti, otpornosti na mikrobiološke uticaje i oksidativni stres. On je amorfan heteropolimer, nerastorljiv u vodi i optički inaktivan, a sastoji se iz fenilpropanskih jedinica spojenih vezama koje nisu podložne hidrolizi. Ovaj polimer se sintetiše nastankom slobodnih radikala, koji se oslobađaju u peroksidazom posredovanoj dehidrogenaciji tri fenil propionskih alkohola: koniferil alkohola, kumaril alkohola i sinapil alkohola. Ova heterogena struktura povezana je C-C i aril etar vezama, sa aril-glicerol β -aril etrom kao dominantnom strukturom (Sanchez, 2009).



Slika 3.1. Struktura lignoceluloze

3.3.2. Koraci u procesu proizvodnje

Glavni izazov u proizvodnji etanola druge generacije iz lignocelulozne biomase je transformacija kompleksnih polimera do prostih šećera koji mogu biti usvojeni od strane mikroorganizama tokom fermentacije. Otuda najveću prepreku u konverziji lignocelulozne biomase u etanol predstavlja njen predtretman. Zbog kompleksne strukture ovih sirovina, predtretmanom se poboljšava njihova razgradnja, omogućava uklanjanje lignina, dolazi do delimične ili potpune hidrolize hemiceluloze i smanjuje se količina kristalne frakcije celuloze.

Takođe, i prosti šećeri, koji ostaju nakon razgradnje hemiceluloze, mogu se konvertovati u etanol. Sirova, netretirana biomasa vrlo je otporna na enzimsku razgradnju. Stoga je razvijen veliki broj različitih metoda predtretmana, s ciljem poboljšanja razgradivosti ovih sirovina, budući da su dosadašnja istraživanja pokazala direktnu korelaciju između uklanjanja lignina i hemiceluloze i razgradivosti celuloze. Ceo niz predtretmana može se primeniti u proizvodnji etanola iz lignocelulozne biomase, s tim da određeni tip predtretmana može uticati samo na neke sastavne komponente biomase. To je uzrok činjenice da se u procesu hidrolize lignocelulozne biomase moraju koristiti i dodatni enzimi, što poskupljuje ceo proces. Predtretman u tehnologiji proizvodnje etanola iz lignocelulozne biomase mora poboljšati efikasnost hidrolize, omogućiti da se izbegne moguća razgradnja ili gubitak ugljenih hidrata, kao i stvaranje nusproizvoda koji inhibiraju dalje procese hidrolize i fermentacije, a ujedno mora biti i ekonomičan (Sun i Cheng, 2002).

Glavni koraci u procesu konverzije su sledeći:

3.3.2.1. Mehaničko usitnjavanje lignoceluloznog materijala

Mehanički ili fizički proces je obično prvi korak u predtretmanu biomase, a njegov cilj je smanjenje veličine materije, odnosno razaranje fizičke strukture. Ovaj korak procesa može se izvesti usitnjavanjem, seckanjem ili mlevenjem. Veličina čestica nakon fizičkog predtretmana je veoma bitan parametar koji treba optimizovati. Upotreba veoma malih čestica može biti nepoželjna zbog prevelike potrošnje energije u operaciji mlevenja, kao i zbog mogućeg negativnog uticaja na narednu metodu predtretmana (Talebnia i sar., 2010). U ovom delu procesa moguća je ogromna potrošnja energije jer on zahteva opremu poput mlina sa noževima i mlina čekićara (Cadoche i Lopez, 1989).

Lignocelulozna biomasa može se usitnjavati i kombinacijom seckanja i mlevenja, s ciljem smanjenja kristalnosti celuloze. Mehaničko odvajanje frakcija, u zavisnosti od veličine čestica, ostvaruje se mlevenjem u mlinovima. Veličina čestica materijala nakon seckanja je 10-30 mm, dok je nakon mlevenja ona 0,2-2,0 mm. Količina energije koja se utroši za mehaničko usitnjavanje poljoprivrednih otpadaka zavisi od željene veličine krajnjeg proizvoda, kao i od karakteristika biomase (Sun i Cheng, 2002).

Utvrđeno je da se čekićastim mlinom postiže željeno usitnjavanje i uvećana gustina pakovanja celuloznog materijala, ali se ne povećava osetljivost celuloze na hidrolizu. Kompresiono mlevenje (sa dva cilindra) je brz metod (traje 5 min ili kraće) za razaranje kristalnih delova, smanjenje stepena polimerizacije celuloze i povećanje gustine pakovanja materijala. Povećanje gustine pakovanja omogućava pripremu emulzije celuloze koncentracije 20-30 %.

Mlin sa kuglama se takođe primenjuje za prevazilaženje barijere koju predstavlja lignin. Celulozni materijali se primenom ovog mlina smanjuju do veličina od 400 mesh-a i manjih i nije se pokazala potreba za bilo kakvim dodatnim predtretmanom za efikasno delovanje celulaza.

Mokro mlevenje se primenjuje istovremeno sa enzimskom razgradnjom celulozne sirovine. Ovo istovremeno mehaničko razaranje i hidroliza uvećava stepen oslobađanja celuloze za 80 % u odnosu na primenu mlina sa kuglama.

3.3.2.2. Fizičko-hemijski predtretman

Cilj predtretmana je da olakša razdvajanje komponenata lignoceluloznog materijala, odnosno lignina, hemiceluloze i celuloze, smanji kristaličnost celuloze i razori strukturu same biomase. Ferndandes i sar. (2009) zaključili su da fizičko-hemijski predtretman sa upotrebom baza ili kiselina poboljšava biodegradaciju nekih lignoceluloznih materijala gde je sadržaj lignina velik. Za određivanje najboljeg načina predtretmana za određeni tip sirovine i proizvod, neophodna je stroga tehnička i ekonomska analiza (Aden i sar., 2002).

Eksplzivna dekompozicija vodenom parom jedna je od najuobičajenih metoda za predtretman lignoceluloznih materijala (McMillan, 1994). U ovoj metodi, samlevena biomasa se podvrgava delovanju zasićene pare na visokom pritisku, nakon čega se pritisak naglo smanjuje, što podvrgava materijal eksplozivnoj dekompresiji. Eksplozivna dekompozicija se obično započinje na temperaturi od 160-260 °C (sa odgovarajućim pritiskom od 0,69-4,83 MPa) tokom nekoliko sekundi do nekoliko minuta pre nego što se materijal izloži atmosferskom pritisku. Ovaj proces izaziva razaranje strukture materijala, degradaciju hemiceluloze i transformaciju lignina usled visoke temperature, što olakšava dalju hidrolizu celuloze (Ohgren i sar., 2007). Tretman parom može se izvesti i u prisustvu katalizatora (kiselina ili baze). Mnogi parametri poput temperature, vremena zadržavanja, koncentracije katalizatora, vremena namakanja, i sadržaja vlage mogu se optimizovati kako bi se poboljšao predtretman vodenom parom (Bruni i sar., 2010).

Kiseline se mogu primeniti u predtretmanu celuloznih materijala, sa ciljem ukljanjanja veza između lanaca hemiceluloze i celuloze. Koncentrovane kiseline poput H_2SO_4 i HCl su dobri reagensi za predtretman, ali, sa druge strane, one su veoma korozivne i opasne (Sun i Cheng, 2002). Predtretmanom sa razblaženim kiselinama postignute su velike brzine reakcije i značajno je poboljšana naknadna hidroliza celuloze (Esteghlalin i sar., 1997). Tokom predtretmana kiselinama na visokoj temperaturi, neki od polisaharida se hidrolizuju, uglavnom hemiceluloza. Dobijeni slobodni šećeri mogu se razgraditi do furfurala (iz pentozna) i 5-hidroksi-metil-furfurala ili HMF (iz heksoza). Ova jedinjenja inhibiraju ćelije kvasca i dovode do smanjenja brzine rasta, brzine proizvodnje etanola i prinosa etanola. Štaviše, njihovo nastajanje znači gubitak fermentabilnih šećera. Organske kiseline poput maleinske i fumarne predložene su kao alternative kako bi se izbeglo nastajanje HMF (Kootstra i sar., 2010).

Baze se takođe mogu upotrebiti za predtretman lignoceluloznih materijala, a uticaj predtretmana zavisi od sadržaja lignina (McMillan, 1994). Za mehanizam alkalnog predtretmana se smatra da je reakcija saponifikacije međumolekulskih estarskih veza između ksilana iz hemiceluloze i drugih jedinjenja, na primer, lignina i drugih hemiceluloza. Kod predtretmana bazama koriste se niže temperature i pritisci u poređenju sa drugim procesima za predtretman (Mosier i sar., 2005).

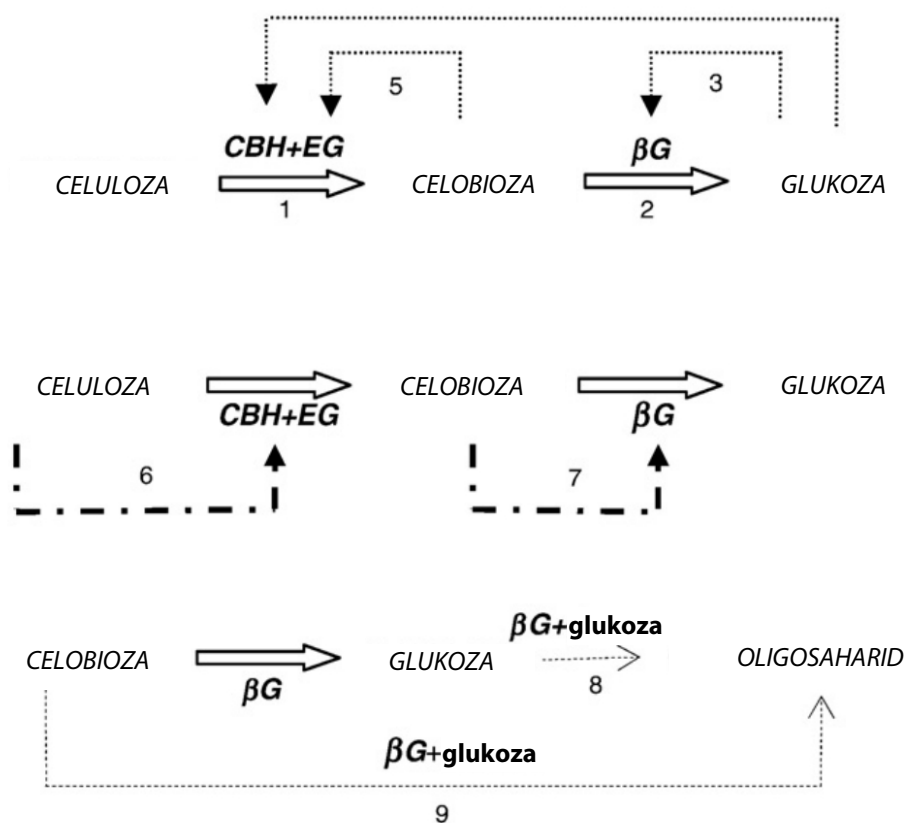
Ovaj predtretman može značajno poboljšati dostupnost celuloze, a degradacija šećera je manja u odnosu na predtretman kiselinama. Međutim, primena ove metode je ometena visokim cenama alkalija (Talebna i sar., 2010). Tretman lignoceluloznog materijala razblaženim NaOH izaziva njegovo bubrenje, što dovodi do povećanja specifične površine, smanjenja stepena polimerizacije, smanjenja kristalčnosti, razdvajanja strukturnih veza između lignina i ugljenih hidrata i razaranja strukture lignina (Fan i sar., 1987).

Predtretman toplom vodom (LHW – *Liquid Hot Water*) je još uvek u fazi razvoja i pokazuje veliki potencijal zbog njegove jednostavnosti, smanjenog nastajanja inhibitornih nusproizvoda i visokih prinosa (Hamelinck i sar., 2005). Ovaj predtretman je hidrotermalni proces, gde se pritisak koristi za održavanje vode u tečnom stanju na povišenim temperaturama. Vrednost temperature varira od 170 do 230 °C a vrednost pritiska je obično iznad 5 MPa (Talebna i sar., 2010). Princip rada ovog procesa je tretman lignoceluloze subkritičnom vodom pod pritiskom, eventualno uz hidrolizu sa CO₂. Drugačije ponašanje tople vode u poređenju sa vodom u ambijentalnim uslovima nastaje usled drastičnih promena u fizičkim osobinama, koje se lako mogu menjati sa promenom temperature i pritiska (Schacht i sar., 2008). Veći prinos ksilana koji ukazuje na smanjeno nastajanje proizvoda degradacije je već postignut u predtretmanu toplom vodom (Schacht i sar., 2008).

3.3.2.3. Hidroliza

Enzimaska hidroliza, kao jedna od komercijalnih tehnika za izdvajanje fermentabilnih šećera iz celuloze, je višestepena reakcija, koja se odvija u heterogenom sistemu, u kom se nerastvorna celuloza razara na mestu kontakta čvrste i tečne faze pomoću zajedničkog dejstva endoglukanaze (EG) (EC 3.2.1.4) i egzoglukanaze/celobiohidrolaze (CBH) (EC 3.2.1.91) (Andrić i sar., 2010a). Ova početna degradacija je praćena daljom hidrolizom rastvorljivih međuproizvoda u tečnoj fazi, odnosno kratkih oligosaharida i celobioze, koji se katalitičkim putem razaraju do glukoze pomoću β-glukozidaze (BG) (EC 3.2.1.21) (slika 3.2, reakcije 1 i 2) (Zhang i Lynd, 2004).

U praksi pri preradi lignocelulozne sirovine, celuloza, koja se podvrgava enzimskoj hidrolizi, je obično već prošla kroz neki fizičko-hemijski predtretman, koji kao rezultat daje celulozu koja se sastoji od amornih i kristalnih delova (Lynd i sar., 2008; Mosier i sar., 2005). Priroda je razvila određene celulaze za degradaciju kristalne celuloze, odnosno celobiohidrolaze, i celulaze za razaranje amornih delova celuloze, pre svega endoglukanaze (Teeri i sar., 1998). Ipak ova heterogenost supstrata izaziva varijacije u stepenu enzimske hidrolize celuloze, koja zavisi od mesta vezivanja enzima za supstrat. Brzine katalitičke reakcije, takođe, mogu da variraju tokom celulolitičke degradacije, s obzirom da se u kasnijim fazama reakcije celuloza, koja se hidrolizuje, obično više nalazi u kristalnom nego u amornom obliku, koja je razorena tokom početnih faza reakcije, i s obzirom da je degradacija kristalne celuloze generalno sporija reakcija od hidrolize amornih delova (Lynd i sar., 2002). Pošto su reakcije po samoj prirodi heterogene, Michaelis-Menten-ova jednačina nije dovoljna za opis ovih reakcija. Stoga su brojni kinetički modeli predloženi za enzimski katalizovanu hidrolizu celuloze (Gan i sar., 2003; Kadam i sar., 2004; Okazaki i Moo-Young, 1978).



Slika 3.2. Inhibicija celulaza: pregled glavnih kinetičkih puteva i interakcija koje se javljaju kod inhibicije proizvodom: (a) glavne reakcije (1,2), (b) inhibicija glukozom (3,4), (c) inhibicija celobiozom (5), (d) inhibicija supstratom (6,7), (e) transglikolizacija (8,9)

Uprkos složenosti ovih dinamičkih modela, osnova svega je naravno a) da enzim mora doći u kontakt sa supstratom, kako bi došlo do reakcije i b) da enzim-supstrat kompleks, kao međuproizvod reakcije, mora nastati pre nego što se formira krajnji proizvod. Otuda su strukture modela primenjenih za opis enzimske katalizovane hidrolize (ligno)celuloze uglavnom zasnovane na modifikovanim jednačinama Michaelis-Menten-ove kinetike. Međutim, ovi modeli su često kombinovani sa kinetikom adsorpcije i u nekim slučajevima uključuju poseban član, tzv. „frakcija dostupnog supstrata“ (Bansal i sar., 2009). Pored toga, članovi za inhibiciju su vrlo često uključeni, kako bi se uračunalo i inhibitorno dejstvo celobioze i glukoze na celulolitičke enzime, a u manjoj meri su uključeni i članovi, koji razmatraju smanjenje enzimske aktivnosti usled nekih drugih razloga, npr. termičke inaktivacije i/ili neproduktivno vezivanje za lignin.

Troškovi izvođenja enzimske hidrolize su mali u poređenju sa kiselom ili alkalnom hidrolizom, jer se obično izvodi u blagim uslovima i ne izaziva probleme sa korozijom (Duff i Murray, 1996). Bakterije i plesni mogu da proizvedu celulaze za hidrolizu lignoceluloznih materijala.

Enzimaska hidroliza celuloze sastoji se dakle iz tri koraka: adsorpcije celulaze na površinu celuloze, hidrolize celuloze do glukoze i desorpcije celulaze. Necelulozne komponente (lignin i hemiceluloza) kao i kristaličnost celuloze čine korak adsorpcije celulaza ograničavajućim po pitanju brzine hidrolize (Han i Chen, 2010). Koncentracija supstrata je jedan od glavnih faktora koji utiču na prinos i inicijalnu brzinu enzimske hidrolize celuloze. Nekoliko metoda je razvijeno kako bi se smanjila inhibicija hidrolize, uključujući upotrebu enzima u visokim koncentracijama, dodavanjem β -glukozidaza tokom hidrolize i uklanjanjem šećera nastalih tokom hidrolize ultrafiltracijom ili istovremenim ošećerenjem i fermentacijom (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

Većina današnjih saznanja o enzimskoj hidrolizi celuloze poizilazi iz ispitivanja celulolitičkih enzima koje proizvodi *Trichoderma reesei*. Celulolitički enzimski sistem *Trichoderma reesei* je intenzivno proučavan u pogledu degradacije celuloze za proizvodnju etanola. Enzime, koje proizvodi *Trichoderma reesei*, sadrže najmanje pet različitih endoglukanaza (EG I-V, ili Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A i Cel45A), dve vrste celobiohidrolaza (CBHI (Cel7A) i CBHII (Cel6A)), kao i određen broj ksilanaza i najmanje jedan enzim β -ksilozidaze (Rosgaard i sar., 2007). *Trichoderma reesei* proizvodi i β -glukozidaze ali je veliki deo vezan za micelijum i zbog toga se ne može u dovoljnoj meri izdvojiti tokom industrijske proizvodnje celulaza (Rosgaard i sar., 2007). Iako je genetski kod za sintezu β -glukozidaze iz *Aspergillus oryzae* uspešno prebačen u proizvodni soj *Trichoderma reesei* (Merino i Cherry, 2007), većina dosadašnjih ispitivanja na upotrebi celulaza *Trichoderma reesei* su primenjivala egzogeno dodavanje β -glukozidaza, kako bi se povećala aktivnost i dejstvo ovog enzima. Ovo egzogeno dodavanje (dopunjavanje) je često izvedeno dodavanjem preparata β -glukozidaze iz *Aspergillus niger* (Andrić i sar., 2010b). Glavni razlog za dodavanje β -glukozidaze je očigledno da bi se obezbedila katalitička hidroliza celobioze i dela oligorasahirda do glukoze. Štaviše, dodatak β -glukozidaze može štaviše da ublaži inhibiciju proizvodom, koju vrši celobioza na celobiohidrolazu i endoglukanazu.

Pored enzimske hidrolize za proizvodnju etanola iz celuloznog materijala primenjuje se i kiselinska hidroliza za izdvajanje prostih šećera iz date sirovine. Kiselinska hidroliza se može podeliti na dva tipa, sa primenom visokih koncentracija kiseline pri niskim temperaturama ili niskih koncentracija pri visokim temperaturama. Odnos prednosti i nedostataka oba tipa zavisi od stepena i ukupnog prinosa hidrolize sa jedne strane i degradacije glukoze do nepoželjnih sporednih proizvoda sa druge strane.

Kristalna celuloza je potpuno rastvorljiva u 72 % H_2SO_4 ili 42 % HCl pri relativno niskim temperaturama (10-45 °C). Polimer se depolimerizuje do oligosaharida, od čega većinu čine celulutetraoze. Vrlo malo monomera glukoze se otpušta u ovoj fazi. Nakon razlaganja u koncentrovanoj kiselini, smeša oligomera se razblaži do niže koncentracije i zagreva do oko 100-200 °C u toku 1-3 h. Ovim postupkom se oligomerni glukozni lanci razlažu do monomernih konstituenata.

Kinetika kiselinske hidrolize pri visokim koncentracijama kiseline ne zavisi od strukturnih detalja ili kristaličnosti celuloznog supstrata. Može se postići prinos glukoze od preko 90 %.

Najveći nedostatak primene koncentrovanih kiselina je taj što se kiselina mora regenerisati i reciklirati da bi proces bio ekonomski efikasan. Operacije regeneracije su, uopšteno posmatrano, ekonomski vrlo zahtevne. Primena HCl ima tehničku prednost nad primenom H_2SO_4 jer je isparljiva kiselina pa se može regenerisati vakuum metodama. Pošto vakuum regeneracija H_2SO_4 nije izvodljiva, njena primena se može ujediniti sa drugim sistemom sa profitabilnim rezultatima. Primer za to je primena proizvoda neutralizacije $CaSO_4$ za proizvodnju gipsa. Dodatne troškove primene procesa sa koncentrovanom kiselinom čine zahtevi za sudovima otpornim na koroziju i reaktorima velike zapremine po jedinici proizvoda zbog dugog vremena reakcije.

Dok je hidroliza celuloze koncentrovanim kiselinama brza i sa malo ili bez zahteva za predtretmanom, prinos fermentabilnih šećera je obično prilično nizak zbog degradacije glukoze izdvojene razlaganjem polimera. U procesima sa primenom razblaženih kiselina nastaje manje proizvoda degradacije, ali je stepen hidrolize niži zbog rezistentnih kristalnih delova celuloze.

Ukupni troškovi procesa u kojima se primenjuje razblažena kiselina su znatno manji nego u slučaju primene koncentrovane kiseline. Stoga nije neophodno reciklirati i vraćati kiselinu u ciklus da bi se postigla ekonomičnost procesa. Uopšteno gledajući, nedostaci primene razblažene kiseline obuhvataju nizak prinos šećera, visoku potrošnju energije usled hidrolize pri povišenim temperaturama i pritiscima i (iako manju nego u slučaju primene koncentrovanih kiselina) potrebu za materijalima otpornim na koroziju.

Hemijska i biohemijska degradacija celuloznih supstrata mogu se porediti razmatranjem brojnih karakteristika svojstvenih ovim procesima, a koje su sumarno prikazane u tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Poređenje procesa enzimske i kiselinske hidrolize celuloznih materijala

Kiselinska hidroliza	Enzimska hidroliza
Nespecifičan katalizator	Specifičan makromolekulski katalizator
Razgradnja hemiceluloze do inhibitornih komponenti (npr. furfurola)	Proizvodnja čistog šećernog sirupa spremnog za anaerobnu fermentaciju
Troškovi opreme veći zbog oštrog uslova rada	Blagi operativni uslovi
Potrebna regeneracija katalizatora zbog visokih troškova za hemikalije	Potrebna regeneracija katalizatora zbog visokih troškova proizvodnje enzima
Visok stepen hidrolize	Niži stepen hidrolize
Nizak ukupan prinos glukoze zbog degradacije	Visok prinos glukoze zavisi od sistema i predtretmana

3.4. Među- i nusproizvodi prerade šećerne repe

Pri preradi šećerne repe u konzumne kristale šećera, javljaju se različiti međuproizvodi ovog procesa kao što su ekstrakcioni, retki i gusti sok, kao i nusproizvodi melasa i izluženi repini rezanci (slika 3.3).

3.4.1. Tehnološki postupak prerade šećerne repe

Tehnološki postupak prerade šećerne repe je kontinualan. Odvija se po fazama procesa koje su međusobno povezane u tehnološku celinu. Pored osnovnog tehnološkog procesa proizvodnje šećera, tehnologija obuhvata pomoćne procese i operacije u pogonima za proizvodnju energije, pomoćnih materijala i dorade nusproizvoda.

Osnovni tehnološki postupak proizvodnje šećera može se podeliti u šest faza po sledećem hronološkom redosledu (slika 3.3):

1. **Priprema šećerne repe za ekstrakciju, difuziju.** Obuhvata: istovar repe u repne kanale, izdvajanje primesa od repe, pranje šećerne repe, rezanje šećerne repe.

2. **Ekstrakcija šećera iz reznaca repe, difuzija.** Proces difuzije izvodi se u protivstrujnom toku repe i vode. Da bi došlo do difuzije šećera mora se razrušiti nativna struktura ćelija, što se postiže zagrevanjem. Ovaj proces se naziva plazmoliza i odvija se na temperaturi od oko 75 °C. Iz plazmoliziranih reznaca, usled razlike u koncentracijama, šećer difuzijom prelazi iz tkiva repe u sok.

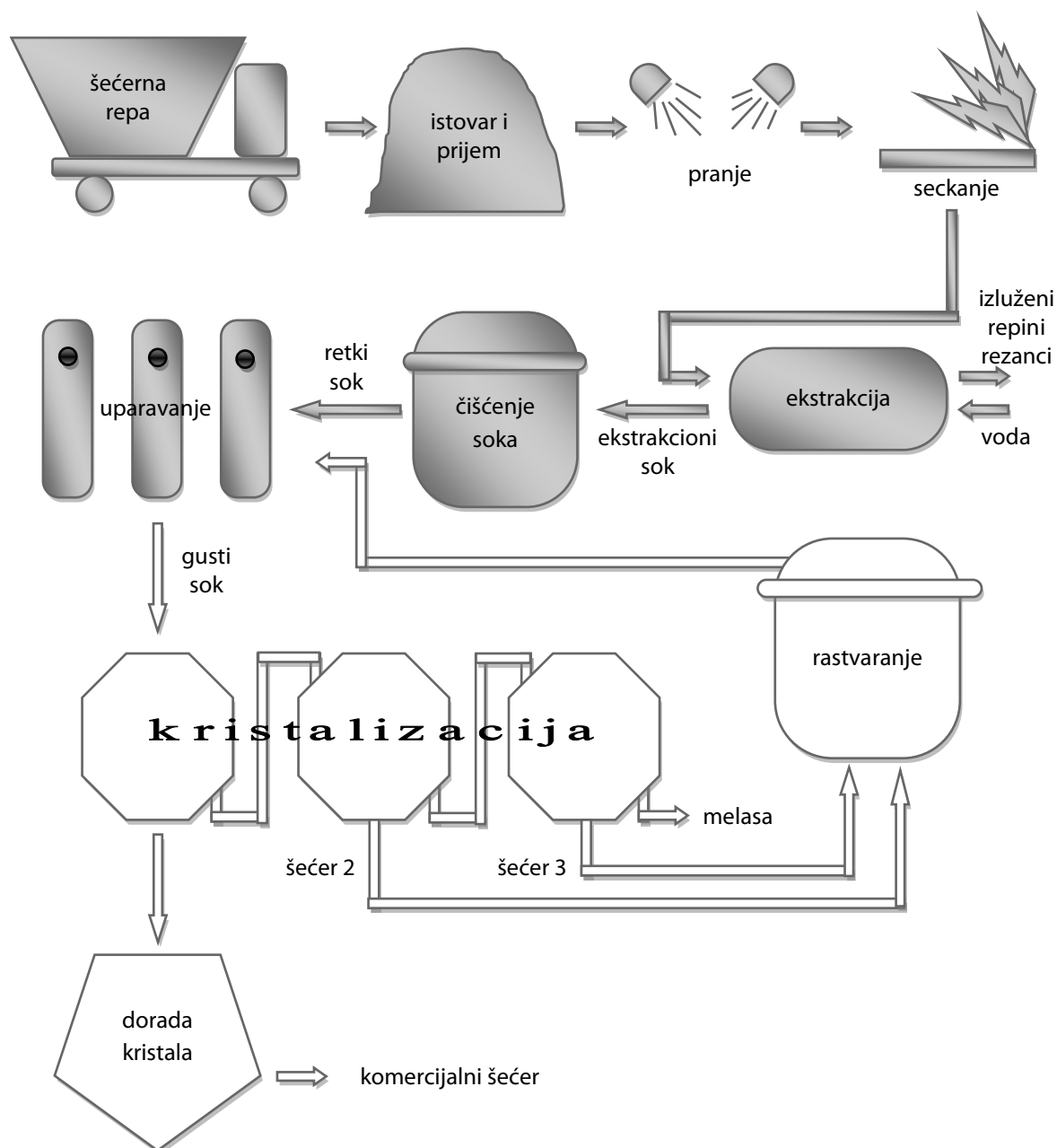
3. **Čišćenje soka.** Cilj čišćenja je, osim uklanjanja nešećera, i da se dobije sok čiji se sastav pri daljoj termičkoj obradi, uparavanju i kristalizaciji, neće menjati.

4. **Koncentrisanje, uparavanje soka.** Otklanjanjem vode iz retkog soka, koncentracije 10-15 % suve materije, dobija se gusti sok koncentracije 60-65 % suve materije. Eventualne promene hemijskog sastava soka u toku uparavanja se ogledaju u porastu sadržaja bojenih materija, redukujućih šećera i alkaliteta soka.

5. **Kristalizacija saharoze.** Gusti sok je nezasićeni rastvor koji se uparavanjem dovodi u oblast presićenosti pa se procesom kristalizacije izdvaja saharoza, a u zasićenom rastvoru, matičnom sirupu, zaostaju nešećeri.

6. **Dorada kristala.** Šećer se suši u rotacionim ili komornim sušarama do 0,03 % vlage.

Deo fabrike u kojem se odvijaju prve četiri feze procesa i dobija međuproizvod (gusti sok) naziva se „sirovi deo“, dok se drugi deo pogona, u kojem se iz gustog soka daljom preradom dobija finalni proizvod – konzumni kristal, naziva „rafinerija“.



Slika 3.3. Tehnološki postupak prerade šećerne repe

Pomenuti sokovi (ekstrakcioni, retki i gusti) i melasa ne zahtevaju nikakvu prethodnu obradu jer je skoro čitav sadržaj šećera u obliku saharoze (Leiper i sar., 2006). Ovaj disaharid se u početnoj fazi fermentacije razlaže na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze, koja se nalazi u periplazmatičnom prostoru između ćelijskog zida kvasca i ćelijske membrane. Jedino je kod gustog soka i melase potrebno izvršiti razblaženje do koncentracije šećera koja odgovara proizvodnji etanola. Sa ekonomske tačke gledišta i u poređenju sa žitaricama, međuproizvodi prerade šećerne repe su veoma dobra sirovina za proizvodnju etanola zbog njihovog sadržaja fermentabilnih šećera, koji se direktno mogu iskoristiti bez ikakve modifikacije.

3.4.1.1. Ekstrakcioni sok

Ekstrakcioni sok sadrži oko 15-20 % suve materije, a čistoća varira u opsegu od 85-90 %, dok 10-15 % čine nešećeri u suvoj materiji. Uzimajući u obzir ove podatke, ekstrakcioni sok se može odmah upotrebiti za fermentaciju nakon podešavanja vrednosti pH. Sve ove karakteristike zajedno sa relativno niskom cenom u poređenju sa ostalim međuproizvodima prerade šećerne repe čine ekstrakcioni sok veoma profitabilnom sirovinom za proizvodnju etanola. Njegov jedini nedostatak je nemogućnost skladištenja i laka razgradnja usled dejstva mikroorganizama. Zbog kratkog perioda žetve šećerne repe i nemogućnosti skladištenja ekstrakcionog i retkog soka tokom dužih vremenskih perioda, vrši se višestepeno uparavanje do visoke koncentracije šećera kako bi se dobijenom gustom soku smanjila zapremina i inhibirao rast mikroorganizama (Dodić i sar., 2009).

3.4.1.2. Retki sok

U tehnologiji šećera, ekstrakcioni sok se pre uparavanja i kristalizacije mora čistiti. Čišćenje podrazumeva izdvajanje suspendovanih grubih nerastvornih nečistoća, neutralizaciju soka i izdvajanje što veće količine koloidno i jonski rastvorenih nešećera. Rastvoreni nešećeri se uklanjaju tako što se prethodno prevedu u nerastvorni oblik, talog, koji se dekantacijom ili filtracijom odvaja od rastvora. Tokom čišćenja ekstrakcionog soka uklanjaju se brojne nečistoće uključujući polivalentne anjone, kao što su: sulfati, fosfati, citrati i oksalati, koji se talože u obliku kalcijumovih soli, i veliki organski molekuli kao što su proteini, saponini i pektini, koji formiraju agregate u prisustvu polivalentnih katjona. Nakon filtracije, dobija se retki sok, međuproizvod svetlo-žute boje, koji sadrži 12-14 % šećera (Krajnc I Glavič, 2009).

3.4.1.3. Gusti sok

Otklanjanjem vode iz retkog soka, dobija se gusti sok koncentracije 60 % do 65 % suve materije. Iz 100 kg šećerne repe dobija se prosečno oko 130 kg retkog soka iz kojeg se uparavanjem dobija 30 kg gustog soka, što znači da se u toku koncentracije otpari oko 100 kg vode/100 kg šećerne repe. Gusti sok, koncentracije 60 % do 65 % suve materije, je nezasićen rastvor; on se daljim uparavanjem dovodi u oblast presićenosti, koja je povoljna za kristalizaciju saharoze. Cilj kristalizacije je da se što kraćim postupkom izdvoje što čistiji kristali šećera i da zadnji sirup, melasa, sadrži što manje šećera.

3.4.1.4. Melasa

Uobičajen sastav melase čini oko 50 % saharoze, oko 30 % nešećera i oko 20 % vode. Međutim, hemijski sastav melase je složen jer se u njoj nalazi preko 200 različitih organskih i neorganskih jedinjenja. Od nešećera melase oko 10 % čine soli među kojima najviše ima kalijumovih. Ostatak nešećera čine organske supstance među kojima najviše ima azotnih jedinjenja. Svakako, glavni sastojak melase su ugljeni hidrati, pretežno saharoza, koje ima oko 50 % (Grahovac, 2011)

Postupak pripreme melase za fermentaciju kvascem *Saccaromyces cerevisiae* obuhvata njeno razblaženje, korekciju vrednosti pH i sterilizaciju. Pri visokim koncentracijama supstrata usled visokog osmotskog pritiska, faktora koji izaziva stres ćelija kvasca, inhibiran je rast kvasca i formiranje proizvoda metabolizma. Stoga je cilj razblaženja melase svođenje koncentracije supstrata na optimalnu. Do značajne inhibicije supstratom dolazi pri koncentracijama šećera u opsegu 5-25 % dok pri koncentraciji od 40 % dolazi do potpune inhibicije rasta. Prilikom razblaženja melase, osim o koncentraciji šećera, treba voditi računa i o koncentraciji ostalih nutrijenata koji mogu inhibirati fermentaciju. Najveći problem u tom smislu je visok sadržaj neorganskih soli u melasi (Ergun i Mutlu, 2000). U tehnologiji etanola melasa se razblažuje vodom do koncentracije šećera 10-18 % (Grahovac, 2011). Pri većim koncentracijama, osim inhibicije supstratom, došlo bi i do inhibicije etanolom kao proizvodom, vreme fermentacije bi se produžilo, a količina zaostalog šećera bi bila visoka. Male koncentracije šećera se ne koriste iz ekonomskih razloga.

3.4.1.5. Izluženi repini rezanci

Izluženi repini rezanci predstavljaju sporedni proizvod industrije šećera koji nastaje nakon ekstrakcije saharoze iz šećerne repe. Njihov visok sadržaj polisaharida čini ovaj nusproizvod atraktivnom sirovinom za proizvodnju etanola. Trenutno se izluženi repini rezanci koriste kao hrana za stoku.

Prednosti primene izluženih repinih rezanaca sa proizvodnju etanola se ogledaju u sledećem:

- Izluženi repini rezanci su jeftin poljoprivredni otpad koji zaostaje nakon prerade šećerne repe,
- Izluženi repini rezanci nastaju na malom broju lokacija gde se nalaze postrojenja velikih kapaciteta za preradu šećerne repe,
- Stoga nema dodatnih troškova transporta i skladištenja izluženih repinih rezanaca,
- Fabrike za proizvodnju šećera već poseduju dobro razrađene sisteme za kontrolu procesa, proizvodnju pare i kontrolu kvaliteta vode. Na ovaj način se smanjuju troškovi infrastrukture širenjem postojećih postrojenja radi proizvodnje etanola, i
- Ostatak (otpad) nakon hidrolize izluženih repinih rezanaca ima visok sadržaj proteina i može se upotrebiti kao dodatak za hrane za stoku.

Trenutno su proizvedene količine šećerne repe u SAD i Evropi kontrolisane regulativama sa ciljem održavanja stabilnih cena šećera. Stoga, prinosi šećerne repe su znatno ispod vrednosti iz perioda sredinom 20. veka. Veći prinosi su dakle mogući u zavisnosti od tržišnih uslova, izmena zakona i kroz upotrebu šećerne repe kao energetske sirovine. Na ovaj način bi se otpočela koproizvodnja etanola u dodatno izgrađenim rafinerijama uz postojeće kapacitete za preradu šećerne repe (Popov i sar., 2010). Koncept proizvodnje šećera i etanola predstavlja atraktivnu opciju, budući da omogućava fleksibilnost u smislu variranja proizvedenih količina šećera i etanola, u zavisnosti od uslova koji vladaju na tržištu (Grahovac, 2011).

3.5. Modelovanje i simulacija u procesu projektovanja

Projektovanje nekog bioprocesa može da traje nekoliko godina, sastoji se iz mnogo koraka i uključuje mnoge, različite učesnike. Troškovi projektovanja zavise od specifikacija proizvoda, složenosti bioprocesa i primene proizvoda. Razvoj novih biofarmaceutskih proizvoda je najskuplji; sa prosečnim troškovima od 300 do 800 miliona dolara, i najduže traje 10-15 godina od momenta ideje o nekom proizvodu do njegovog odobrenja. Razvoj proizvoda za hemijsku, prehrambenu i industriju stočne hrane je jeftiniji i kraće traje, ali ipak zahteva znatna ulaganja kada se radi o vremenu i novcu.

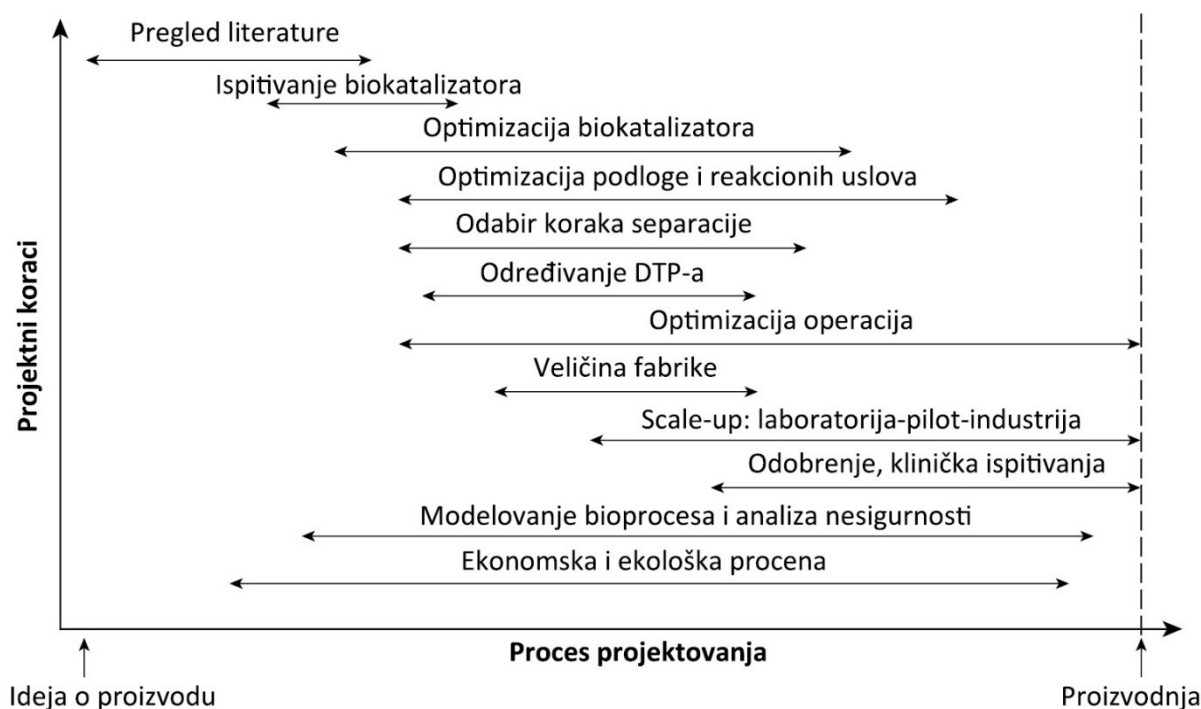
Osnova svakog procesa projektovanja treba da bude dobro napravljen hronološki raspored za istraživanje i razvoj (R&D – *Research and Development*), kao i definisana putanja koja fokusira napore na najbitnije probleme i obećavajuće mogućnosti. Jasan raspored pomaže u smanjenju vremena projektovanja i povećava šanse za stvaranje konkurentnog i ekološki bezbednog bioprocesa koji se može realizovati u industrijskim razmerama. Raspored mora redovno da bude prilagođen novostečenom znanju, do kojeg se dolazi tokom procesa projektovanja.

Za vreme projektovanja bioprocesa moraju se doneti mnoge odluke. Zbir ovih odluka i vremenski rokovi njihovih realizacija određuje da li će bioproces biti uspešan ili ne. Uspešan bioproces zahteva najbolju moguću osnovu za donošenje odluka u svim tačkama projektovanja, od stvaranja ideje o proizvodu do realizacije industrijskog proizvodnog postrojenja. Postoje dva kritična aspekta u donošenju odluka. Kao prvo, za svaku bitnu odluku moraju biti prikupljeni i procenjeni svi neophodni podaci o bioprocesu i njegovom društveno-ekonomskom okruženju. Stoga, neizbežno je blagovremeno uključivanje relevantnih aktera u razvojni proces. U zavisnosti od odluke, mogu se uključiti stručnjaci iz marketinga, pravnih i sektora za patente i stručnjaci ekologije, pored biologa, hemičara i biohemijskih inženjera koji već rade na projektu. Početne faze procesa projektovanja određuju najveći deo troškova, kao i ekološki uticaj krajnjeg industrijskog bioprocesa. Stoga, bitno je naći odgovarajuću osnovu i angažovati različite učesnike za istraživanje i razvoj još od samog početka procesa projektovanja (Heinzle i Hungerbuhler, 1997).

Cilj projektovanja jeste da se stvori optimalan celokupan bioproces za proizvodnju željenog proizvoda. Ovo eksplicitno uključuje uzimanje u obzir da pojedinačne procesne faze ili jedinice, kao što su fermentacija ili različiti bioseparacioni uređaji, mogu da odstupaju od svog optimalnog načina rada. Na primer, upotreba seruma tokom kultivacije animalnih ćelija poboljšava njihov rast i prinos proizvoda. Međutim, komponente seruma usložnjavaju izdvajanje i prečišćavanje proizvoda do mere da je prihvatljivije imati manji prinos pri fermentaciji bez seruma, kako bi se poboljšala separacija. Modelovanje bioprocesa pomoću alata poput SuperPro Designer, koji će se koristiti u rešavanju različitih problema sadržanih u ovoj disertaciji, veoma je efikasno u određivanju kompromisa i donošenju odluka u ranim fazama procesa projektovanja.

3.5.1. Koraci projektovanja i učesnici

Projektovanje bioprocasa i proizvoda uključuje nekoliko koraka. Kao što je prikazano na slici 3.4, oni ne formiraju linearni niz nezavisnih koraka, već u svakom trenutku projektovanja, nekoliko koraka teku paralelno i deluju jedan na drugi.



Slika 3.4. Koraci u projektovanju bioprocasa, od ideje o nekom proizvodu do proizvodnog postrojenja (DTP – dijagram toka procesa)

Kao cilj svakog procesa projektovanja nekog postrojenja postavlja se proizvod. Specifikacija proizvoda je faktor koji uspostavlja cilj procesa realizacije nekog projekta. Ovaj proizvod mora imati tržište, ili makar potencijalno tržište, dovoljno veliko da ekonomski opravda potrebna ulaganja za razvoj njegovog procesa proizvodnje. Željeni proizvod mora biti jasno definisan i određen (kvalitet, čistoća itd.).

Nakon definisanja proizvoda, neophodno je detaljno pregledati dostupnu literaturu i patente. Ovim pregledom dobija se informacija o tome da li već postoji neki sličan proizvod na tržištu ili u procesu razvoja. Takođe, neophodno je odgovoriti na par pitanja. Da li konkurencija radi na istom proizvodu? Da li postoje patenti koji sprečavaju upotrebu tehnologije koja je potrebna za proizvodnju željenog proizvoda? U principu, da li postoji sloboda za rad i da li se ostali mogu isključiti iz tržišta? Pregled literature uključuje, takođe, potragu za odgovarajućim biokatalizatorom, bioprocenom i operacijama za dobijanje i prečišćavanje proizvoda.

Biokatalizator ima glavnu ulogu u bioprocenima. Stoga je potrebno imati organizam ili enzim koji katalizuje nastanak željenog proizvoda. Kada je nađen odgovarajući biokatalizator, on se mora optimizovati, kako bi se postigao ekonomski isplativ prinos i koncentracija proizvoda.

U principu, postoje dva načina za ovu vrstu optimizacije. Jedan je da se nativnom organizmu, za koji je ustanovljeno da proizvodi dati proizvod, poboljšaju proizvodne karakteristike, dok se po drugom geni odgovorni za proizvodnju prenose u neki organizam domaćina, koji može da se razvija na jeftinim hranljivim podlogama (*Escherichia coli*). Oba načina uključuju klasično poboljšanje vrste, kao i genetičko inženjerstvo (Stephanopoulos i sar., 1998).

Paralelno sa optimizacijom biokatalizatora, podešavaju se hranljiva podloga i reakcioni uslovi, kako bi se postigao najbolji učinak biokatalizatora. Hranljiva podloga treba da bude što jednostavnijeg sastava i što je moguće jeftinija, ali ipak da omogući optimalan rad biokatalizatora, u vezi sa rastom i nastankom proizvoda (Dodić i Grahovac, 2013). Mogu se ispitati različiti sastavi i koncentracije, poput upotrebe različitih izvora ugljenika i azota (nekoliko šećera, skrob, melasa, ekstrakt kvasca, voda od močenja kukuruza itd.). Štaviše, moraju se uzeti u obzir komponente hranljive podloge zbog kasnijeg izdvajanja i prečišćavanja proizvoda. Takođe, mora se uzeti u obzir i lanac snabdevanja (npr. da li je potrebna sirovina, odgovarajućeg kvaliteta i prihvatljive cene, dostupna u dovoljnim količinama).

Odabrani reakcioni (operativni) uslovi treba da obezbede najbolje okruženje (temperatura, vrednost pH, pritisak, kiseonik itd.) za biokatalizator i homogenost u bioreaktoru. Ovo uključuje modelovanje i funkcionisanje bioreaktora. Kod modelovanja bioreaktora moraju se ispitati različiti tipovi mešalice i odnosi visina/prečnik. U većini slučajeva, međutim, geometrija bioreaktora je već unapred data, a samo operativni uslovi mogu se menjati (Dodić i Popov, 2009). Najbolji aeracioni i uslovi mešanja moraju se podesiti za brzinu aeracije, aeraciju pomoću vazduha, čistog kiseonika, ugljenik(IV)-oksida ili vazduha obogaćenog kiseonikom itd. Profili dovođenja ovih gasova moraju se optimizovati radi optimalnog učinka. Hranljiva podloga i operativni uslovi enzimskih bioprocasa obično su jednostavniji od fermentacionih.

Kada se znaju koncentracije, na kraju bioprocasa treba odabrati odgovarajuće korake za izdvajanje i prečišćavanje. Tada se sastavlja dijagram toka procesa (DTP) koji se sastoji od operacija za pripremu i sterilizaciju hranljive podloge, samog bioprocasa i separacionih tehnika. Za separacioni deo moraju se odabrati i povezati odgovarajuće operacije, kako bi se postiglo efikasno izdvajanje i prečišćavanje proizvoda. Sve operacije su zasnovane na različitim hemijskim i fizičkim osobinama između proizvoda i ostalih komponenti hranljive podloge (Antov, 2010). Najefikasniji način primene ovih operacija jeste taj da se prvo upotrebe one koje koriste najveće razlike, npr. razlika u faznom stanju pri izdvajanju biomase od rastvorenog proizvoda. Obično se porede različite alternative i dijagram toka se menja tokom projektovanja i scale-up-a bioprocasa. Svaka operacija se optimizuje ka krajnjem cilju, odnosno maksimalnom ukupnom prinosu proizvoda (Heinzle i sar., 2006).

Tokom scale-up-a određuje se veličina postrojenja. U ovoj fazi proverava se veličina tržišta i udeo proizvoda na tržištu procenjena na početku procesa projektovanja. Ove dve vrednosti određuju godišnju proizvodnju postrojenja. Očekivana koncentracija proizvoda, vreme trajanja bioprocasa i prinos separacije, koriste se za procenu neophodne veličine i broja bioreaktora (Panda, 2011).

Bioproces se prevodi iz laboratorijskih uslova, često preko pilot postrojenja, u industrijske razmere (Dodić i Popov, 2011). Laboratorijski nivo uključuje nekoliko koraka od laboratorijskih erlenmajera do laboratorijskog bioreaktora zapremine obično manje od 5 L.

Pilot postrojenja obično imaju zapreminu do 500 L ili zahtevaju protok do 100 L/h u slučaju kontinualnih bioprocasa. Nakon optimizacije, pilot postrojenje bi trebalo da bude manje ili više identično industrijskom postrojenju sa svim povratnim tokovima, rasporedom rada i materijalima za uređaje (Storhas, 2003). Proizvodno postrojenje se razlikuje jedino u kapacitetu, obično od 10 do 1000 puta većem. Pilot postrojenje daje prve uzorke za tržište ili, u slučaju farmaceutskih proizvoda broj potrebnih kliničkih ispitivanja.

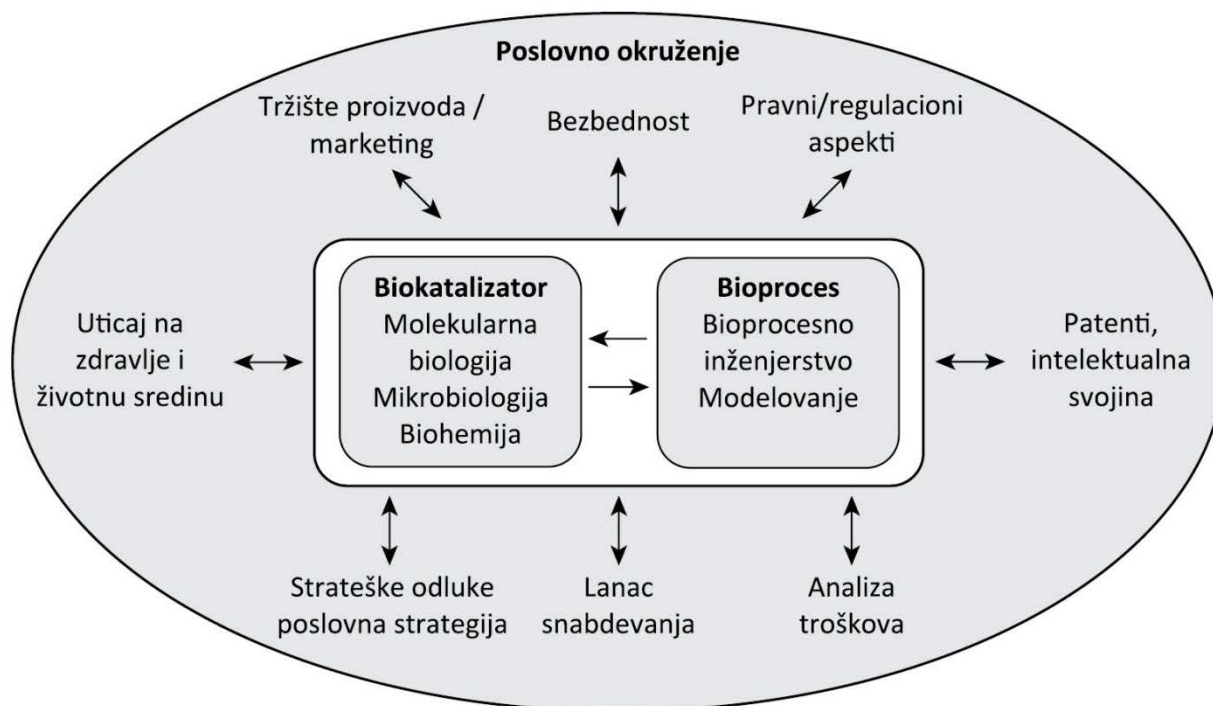
Čim su prvi podaci o bioprocusu dostupni, oni se mogu iskoristiti za njegovo modelovanje, radi proračuna materijalnih bilansa, potrošnje energije, potreba radne snage i opreme za proizvodni proces. Modeli se unapređuju sa svakim korakom u procesu projektovanja. Uticaj mogućih promena u bioprocusu, pretpostavke i procene napravljene pomoću modelovanja, moraju se proveriti analizom nesigurnosti (Liu i Antolli, 2012).

Kada je u pitanju diskontinualna proizvodnja, različiti delovi opreme su zauzeti tokom različitih vremenskih perioda. Radi optimizacije godišnje proizvodnje i minimizacije troškova ulaganja po jedinici proizvoda, vreme mirovanja različitih delova postrojenja treba da bude minimalno (Diwekar, 2014). Obično je neki separacioni korak "usko grlo" u diskontinualnoj proizvodnji. Vreme mirovanja separacionih uređaja se, na primer, može smanjiti upotrebom nekoliko manjih bioreaktora umesto jednog velikog. Procedura optimizacije zauzetosti opreme naziva se planiranje vremenskog rasporeda, a najefikasnije se izvodi upotrebom odgovarajućih procesnih simulatora (Vučurović i sar., 2012).

Još od ranih faza razvoja, eksperimentalni i rezultati modelovanja koriste se za analizu ekonomskih i ekoloških aspekta, kako bi se realizovao održiv bioproces.

Koraci projektovanja, kao i sam bioproces, moraju biti dokumentovani do detalja. Jasna dokumentacija o pretpostavkama, procenama, problemima i alternativama tokom procesa projektovanja, pomaže u donošenju daljih odluka. Opis bioprocasa je neophodan za izgradnju proizvodnog postrojenja, ocenu bioprocasa, i često za odobrenje proizvoda.

Uspešan razvoj uključuje mnoge različite učesnike, kao što je prikazano na slici 3.5. Identifikacija, inženjerstvo i kultivacija proizvodnog soja ili enzima uključuje specijaliste iz oblasti molekularne biologije, mikrobiologije, biohemije, genetičkog inženjerstva i drugih, u razvojni tim. Biohemijski, hemijski i procesni inženjeri projektuju i optimizuju bioproces. Stručnjaci ekologije moraju obezbediti to da bioproces bude ekološki bezbedan i da se svaki otpad preradi pre njegovog ispuštanja u okolinu. Tim za marketing procenjuje potencijalno tržište proizvoda, a može i da pruži informacije o zahtevanoj čistoći proizvoda i o tome da li određene sirovine mogu da stvore negativnu sliku o proizvodu na tržištu. Na primer, upotreba animalnog seruma u fermentaciji terapijskih proteina smanjuje potencijal prodaje u zemljama, gde većina ljudi ne jede meso niti proizvode na bazi mesa iz religijskih uverenja.



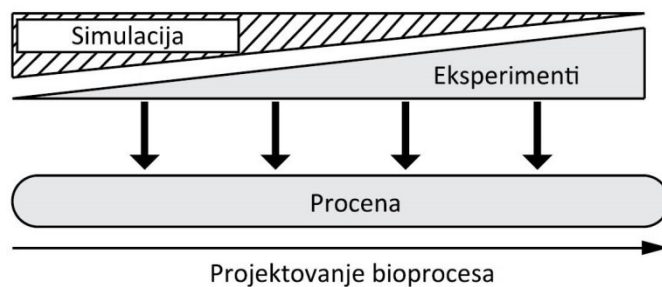
Slika 3.5. Učesnici projektovanja i njihove interakcije tokom razvoja bioprocesa

Tim za patente pomaže u identifikaciji moguće konkurencije i ispitivanju da li je tehnologija, koja želi da se koristi u bioprocusu, zaštićena patentom. Takođe, taj tim priprema patent za svoj bioprocen. Modelovanje bioprocesa i analiza troškova su važni alati u procesu projektovanja. Delimično treba da budu primenjeni od strane projektanta bioprocesa, ali često je neophodna saradnja različitih stručnjaka. Svaki bioproizvod, bilo da je u pitanju lek, hrana, aditiv ili hemijski intermedijer, zahteva neki vid odobrenja. Ovim aspektom bavi se pravni tim. Na kraju, menadžment treba da odluči da li se bioprocen uklapa u poslovnu strategiju kompanije i da li postoji mogućnost sinergetskog efekta sa drugim poslovnim jedinicama.

3.5.2. Modelovanje i simulacija

Modelovanje (definisane pomoću matematičkih jednačina) i simulacija (rešavanje jednačina modela) bioprocesa poboljšava uvid i razumevanje bioprocesa i pomaže u identifikaciji potencijalnih poboljšanja, kao i mogućih poteškoća (Ghasem, 2012). Tokom procesa projektovanja, simulacija može da zameni eksperimente, kako bi se proširila osnova za donošenje odluka (slika 3.6).

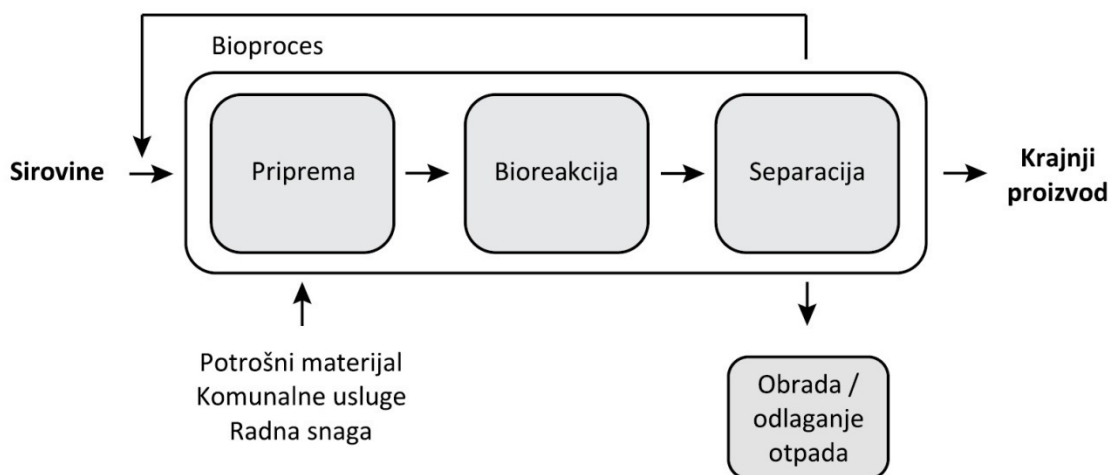
Postoje mnogobrojne knjige iz hemijskog inženjerstva, koje se bave modelovanjem hemijskih procesa (Andreson, 2000; Dimian, 2003; Lewin, 2003). Dok je opšti pristup sličan, tipični bioproceni se razlikuju u kinetici formiranja proizvoda, strukturi bioprocesa i operativnim ograničenjima u odnosu na hemijske procese.



Slika 3.6. Uloga modelovanja i simulacije u proširenju baze podataka za donošenje odluka u procesu projektovanja

3.5.2.1. Šema bioprocasa

Pre ulaska u detalje modelovanja, treba razmotriti osnovne komponente datog bioprocenog sistema, čiji je opšti pregled prikazan slikom 3.7. Sirovine ulaze u bioprocen i prevode se u krajnji proizvod. U bioprocenima se obično, kao reaktanti ili supstrati, koriste kompleksne sirovine. Štaviše, dodatni materijali, poput rastvarača i mineralnih soli, koriste se u bioprocenu i izdvajanju i prečišćavanju proizvoda. Pored sirovina, bioprocen zahteva potrošnju materijala poput hromatografskih smola i filtracionih membrana, komunalne usluge, poput električne energije, pare i vode za hlađenje, i na kraju, radnu snagu za vođenje bioprocasa.



Slika 3.7. Šema i celine bioprocasa

Bioprocen se dakle može podeliti na tri celine:

- 1) pripremu,
- 2) bioreakciju i
- 3) separaciju.

Procesi u fazi pripreme obezbeđuju neophodnu količinu inokuluma i hranljive podloge za bioreakciju. Bioreakcija uključuje bioreaktor i svu prateću opremu, kao što su kompresori i filtri za sterilizaciju vazduha, koji se uvodi u bioreaktor (Dodić i Popov, 2011). Ona predstavlja centralni deo biotehnološkog postupka u kojem se sirovine prevode u željeni proizvod posredstvom biokatalizatora. Obično nastaju i sporedni proizvodi, a deo sirovine ostaje neiskorišćen, čime nastaje otpad bioprocesa. Sledi deo separacije, koji uključuje sve korake neophodne za izdvajanje i prečišćavanje proizvoda od ostalih materija, kako bi se dobio željeni proizvod odgovarajućeg stepena čistoće.

Svi materijali koji nisu prevedeni u krajnji proizvod, niti valorizovani kao sporedni proizvodi ili ponovo vraćeni u bioproces, postaju otpad i zahtevaju određenu vrstu obrade ili odlaganja. Obično granice sistema ograđuju tri osnovne celine bioprocesa (pripremu, bioreakciju i separaciju), ali ne i korake obrade otpada. Često su troškovi obrade ili odlaganja otpada direktno poznati i uzeti u obzir, umesto da se uključuje neophodna oprema u sistem. Međutim, određeni koraci predtretmana koji su potrebni za obezbeđenje zadovoljavajućeg kvaliteta otpada po standardima rutinski su pokriveni sistemom. Na primer, rastvor visoke vrednosti pH mora biti neutralisan pre nego što se može ispustiti u gradsku kanalizaciju. Sistem bioprocesa treba da predstavi sve relevantne korake i tokove unutar svojih granica.

3.5.2.2. Koraci modelovanja

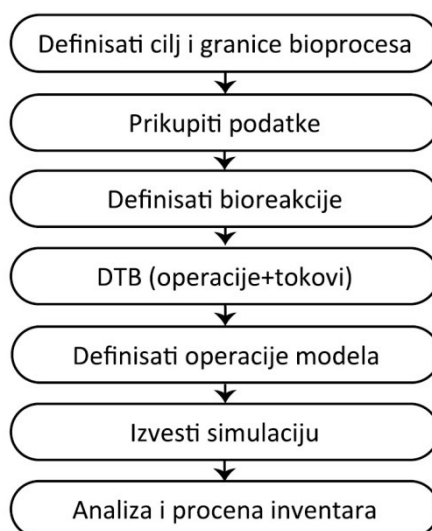
Modelovanje se izvršava u nekoliko koraka, a to su:

- definisanje cilja granice modela,
- prikupljanje podataka,
- postavljanje modela bioprocesa,
- definisanje dijagrama toka i operacija i
- prikupljanje dokumentacije.

Slika 3.8. prikazuje pregled koraka u procesu modelovanja.

Definisanje cilja i granice modela. Za uspešno modelovanje neophodno je definisati cilj modelovanja na samom početku, što uključuje specifikaciju krajnjeg proizvoda, veličinu postrojenja, biokatalizator i granice modela. Za krajnji proizvod, bitno je definisati neophodnu čistoću i ostalu specifikaciju.

Veličina postrojenja ima velik uticaj na troškove bioprocesa. Stoga, važno je izabrati realnu veličinu postrojenja u modelu. Veličina postrojenja može se dobiti iz očekivane godišnje proizvodnje. Odluka se donosi na osnovu trenutne ili očekivane veličine tržišta, tehničke izvodljivosti bioprocesa, poslovnog plana kompanije i uticaja konkurencije. Uglavnom, svaki model mora da uključi sve neophodne procesne korake, ali tako da se složenost bioprocesa svede na minimum.



Slika 3.8. Koraci modelovanja i procene bioprocasa

Prikupljanje podataka. Nakon definisanja ciljeva i granica modela, moraju se prikupiti odgovarajući podaci. U osnovnom slučaju, mogu se iskoristiti podaci iz sopstvenih eksperimenata (ispitivanja). Međutim, obično su eksterni podaci neophodni za dopunu određenih podataka. Tabela 3.4 prikazuje uobičajene izvore podataka i mogućih poteškoća, koje mogu nastati tokom njihovog prikupljanja. Često, vrednosti parametara moraju biti uzete iz različitih izvora ili ekstrapolirane iz uslova koji se razlikuju od sopstvenih, npr. veličina, operativni uslovi, biokatalizator itd. Stručna procena pouzdanosti i primenljivosti podataka je neophodna.

Tabela 3.4. Mogući izvori podataka i problemi koji se obično javljaju

Izvor podataka	Moguće poteškoće
Sopstveni eksperiment	Veličina, opstanak/dostupnost
Prethodni projekat sličnog bioprocasa	Prenosivost, zastareli podaci
Literatura	Preciznost, aktuelnost, prenosivost
Patenti	Preciznost, (pravna) upotrebljivost
Mišljenje stručnjaka	Stvarna dostupnost, opseg mišljenja
Sopstvene procene	Validacija

Model bioreakcije. Obično se modelovanje započinje bioreakcijom. Iz prikupljenih podataka i opšteg znanja o bioprocasu izvode se reakcione jednačine i uslovi. Prvo se navode sirovine potrebne za primenjeni biokatalizator. U sledećem koraku, određuju se parametri poput prinosa, kultivacionog vremena, koncentracije krajnjeg proizvoda, nastanka sporednih proizvoda, itd. Podaci o reakcijama su ili unapred poznati ili se primenjuje kinetički ili stehiometrijski model za proračun ovih parametara. Dodatno, moraju se definisati reakcioni uslovi za model bioprocasa.

Dijagram toka bioprocesa i operacije. U sledećem koraku postavlja se dijagram toka bioprocesa (DTB, slika 3.8). Sve procedure i koraci modela postaju određeni. Svaka operacija mora biti opisana u modelu, a parametri modela moraju biti definisani.

Dokumentacija. Svaki model ima svoje pretpostavke, procene i pojednostavljenja. Njihov uticaj na pojedinačne korake i celokupan učinak može se sagledati analizom nesigurnosti. Međutim, sve pretpostavke, procene i pojednostavljenja neophodno je dokumentovati u pisanom obliku, uz objašnjenje zašto su određene vrednosti odabrane. Transparentna dokumentacija modela služi kao sigurnost ili polazna tačka i omogućava drugima da razumeju i protumače rezultate simulacije i identifikuju nesigurnosti.

Model se formira i na kraju prenosi u odgovarajući softver, gde se izvodi simulacija. Pored poboljšanja opšteg razumevanja bioprocesa, rezultati simulacije se koriste za procenu održivosti i optimizaciju.

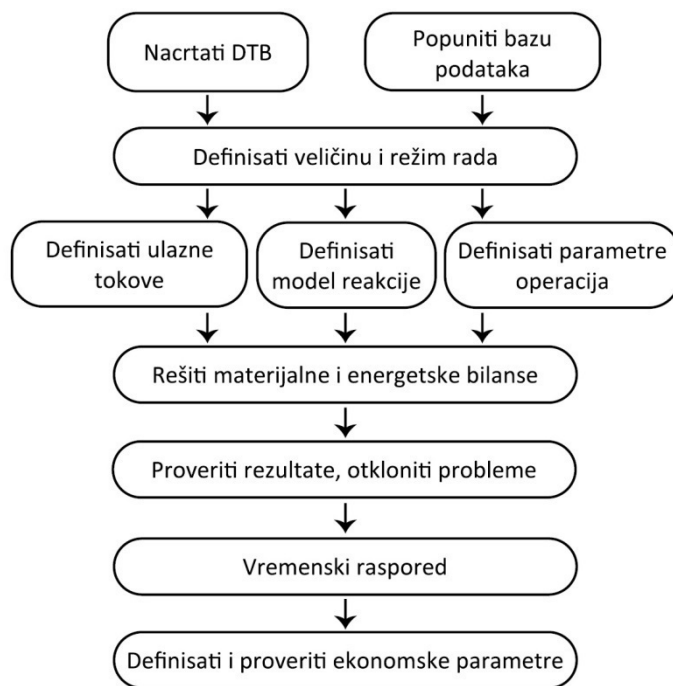
3.5.2.3. Modelovanje pomoću simulatora bioprocesa

U ovoj disertaciji koristi se simulator bioprocesa SuperPro Designer™ vlasništvo kompanije Intelligent, Inc. (Nju Džersi, SAD). Detaljniji opis i uvod u ovaj program je dat u priručniku SuperPro Designer User's Guide. Alternativni alati za modelovanje bioprocesa su takođe dostupni, poput AspenTech (Masačusets, SAD) (Shaklin i sar., 2001).

Slika 3.9 prikazuje pregled uzastopnih koraka pri simulaciji. Prvi korak je formiranje DTB na radnoj površini simulatora. Simulator pruža modele za većinu procedura i opreme koja se obično koristi u bioprocima. Ikone opreme se spuštaju na radnu površinu po redosledu koji zauzimaju u bioprocima. DTB se kompletira pomoću ulaznih tokova, tokova koji povezuju uređaje i izlaznih tokova, koji prelaze granicu modela.

Preporučuje se definisanje različitih sekcija bioprocesa, npr. priprema, bioreakcija i separacija. Ovo olakšava analizu rezultata simulacije i omogućava podešavanje različitih vrednosti parametara opšteg modela u različitim sekcijama (Sengupta i Pike, 2013). Na primer, ulazak u detalje, može biti drugačiji za sekciju bioreakcije i separacije.

Pre početka detaljnog modelovanja pojedinačnih jedinica mora se sastaviti baza podataka bioprocesa. Ova baza podataka sadrži sve materijale koji ulaze u bioproc ili nastaju tokom bioprocesa. Obično, softver ima rezervnu kopiju („backup“) baze podataka koja sadrži najčešće upotrebljavana jedinjenja. Ostali materijali moraju se definisati. Baza podataka može da sadrži širok opseg osobina materijala. Kako bi se ubrzao ovaj proces, unos vrednosti osobina mogu se ograničiti samo na one, koje su bitne za bioproc. Kombinacije materijala, koje se redovno koriste, mogu se definisati kao smese, npr. 5 M hlorovodonična kiselina.



Slika 3.9. Koraci rešavanja modela u softveru za simulaciju bioprocesa

U sledećem koraku određuje se DTB i sve uključene operacije. Pre specifikacije ulaznih tokova i jedinica modela, mora se odrediti veličina bioprocesa, npr. definisanjem potrebne zapremine bioreaktora. Pri specifikaciji jedinica modela, preporučuje se da se napravi kopija DTB i započne novi sa istom bazom podataka materijala. Ovde se prva procedura i njeni tokovi crtaju i specifikuju, i ovaj deo modela se ispituje sve dok se ne isprave sve greške. Nakon toga se dodaje sledeći procesni korak i specifikuje. Za svaki korak moraju se definisati tokovi koji ulaze u bioprocen, a zatim se podešava sastav toka. Zatim se ukupna masa ili zapremina toka definiše direktno u specifikacijama toka. Definisanjem veličine toka, određuje se veličina opreme sa kojim je povezan, npr. sud za mešanje. Alternativno, ukupna masa/zapremina ostaje promenljiva, a parametri modela prijemne opreme zahtevaju ulaznu količinu. Na primer, sud za mešanje definisane veličine puni se do određene zapremine.

Većina procedura sastoji se od nekoliko uzastopnih koraka. Za sud sa mešanjem tipičan redosled koraka je: (i) uvođenje vode i ostalih komponenti, (ii) mešanje sadržaja suda i (iii) izvođenje sadržaja iz suda. Redosled mora biti definisan.

Simulator bioprocesa uključuje unapred definisane modele za većinu operacija bioprocesa. Stoga se samo parametri modela moraju definisati. Model procedure je obično objašnjen u dokumentima za pomoć. Vrednosti parametara se uzimaju iz prikupljenih podataka o bioprocenu ili iz korisnikovog inženjerskog znanja. Softver obično pruža uobičajene vrednosti, koje predstavljaju srednje vrednosti za procedure i stoga su velika pomoć u ranim fazama projektovanja. Za osnovne elemente, ove vrednosti mogu da se pretpostave. Međutim, one mogu značajno varirati od situacije do situacije. Stoga se, u detaljno opisanom modelu, preporučuje što manja upotreba uobičajenih vrednosti.

Broj neophodnih parametara zavisi od složenosti operacije. Za jednostavan procesni korak, poput uvođenja sirovine u bioreaktor, dovoljno je definisati ulazni tok, vreme početka i brzinu punjenja. U bioreakcionom koraku, jedna ili više reakcionih jednačina se definiše na bazi mase ili mola, kako bi se opisao nestanak reaktanata i nastanak proizvoda i sporednih proizvoda.

Često, bioproces uključuje nekoliko identičnih delova opreme, npr. nekoliko bioreaktora koji rade u raskoraku (Towler i Sinnott, 2013). Kako bi se svaki korak modelovanja olakšao, preporučuje se da se prvo modeluje bioproces sa samo jednim komadom opreme. Kada ovakav model daje zadovoljavajuće rezultate, on se može proširiti. Efikasan vremenski raspored je neophodan za optimalnu proizvodnju i ekonomski prihvatljiv bioproces. Međutim, u procesu modelovanja, preporučuje se – da se ne obraća previše pažnje na vremenski raspored, sve dok svaka operacija u diskontinualnom postupku ne predstavlja pojedinačnu radnu jedinicu (Petrides i sar., 2002). Tek tada model treba proširiti na željeni broj bioreaktora ili separacionih jedinica (npr. hromatografske kolone).

Pored sirovina, bioproces zahteva komunalne usluge, potrošne materijale i radnu snagu. Različite vrste komunalnih usluga i potrošnih materijala su unapred definisane u programu. Nakon prikladnog rada osnovnog modela, ove definicije treba proveriti u odnosu na bioproces koji se razmatra. Na primer, časovni troškovi za radnu snagu mogu biti drugačiji za različite lokacije ili upotrebljena para može imati drugačiju temperaturu, i stoga obezbediti drugačiju količinu toplote od one koja je predviđena modelom. Godišnji utrošak potrošnog materijala, npr. membrana ili hromatografskih smola, definisan je na osnovu količine potrebne po jednoj šarži, maksimalnih radnih časova i veka trajanja. Mogući izvori informacija o ovim parametrima mogu biti eksperimentalni podaci, dobavljači ili literatura. Količina radne snage je definisana za svaku operaciju i određuje broj ljudi po smeni i broj smena.

Proces modelovanja je visokoiterativan. Obično je potrebno mnogo korigovanja tokom podešavanja realnog modela. Rezultate je obično teško precizno proveriti. Zato je neophodno redovno proveravati, bar verodostojnost rezultata, proverom veličina vrednosti tokova i njihovih sastava, kao i vrednosti parametara modela, pregledom izveštaja nakon simulacije. Neophodno je proveriti pretpostavke koje se tiču komunalnih usluga, potrošnog materijala i radne snage. Kada je osnovni model potpun, ponovo je potrebno nekoliko „pokretanja“ simulacije, kako bi se odredio broj bioreaktora i optimizovao vremenski raspored. Krajnji tehnički model rezultuje materijalnim i energetskim bilansom bioprocasa.

Nakon provere tehničkog modela, podešavaju se ekonomski parametri bioprocasa i modela. Program obezbeđuje osnovne informacije o cenama i komplet alata za ekonomsku procenu. Međutim, paralelno sa tehničkim modelom, mora biti proveren i ekonomski model.

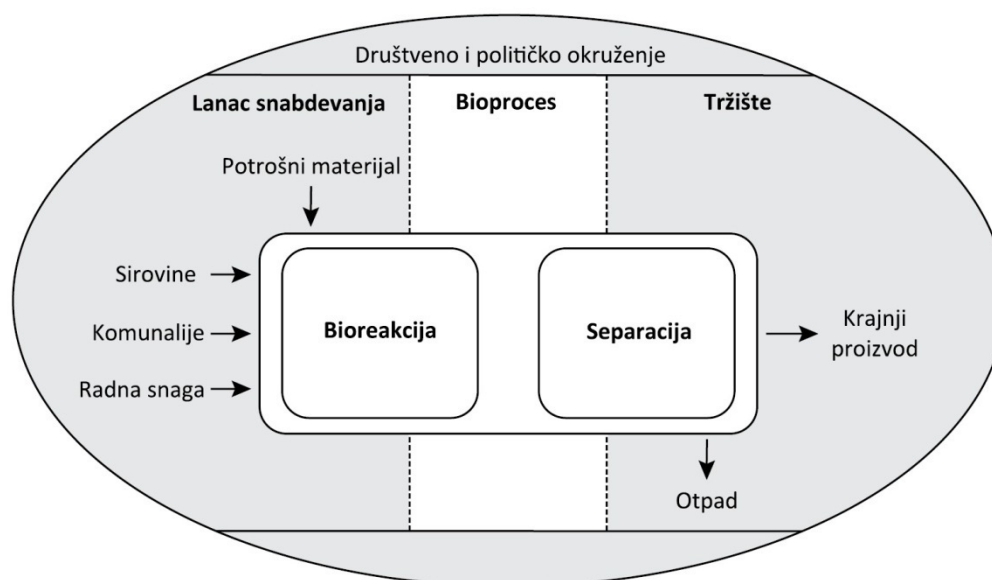
3.5.2.4. Analiza nesigurnosti

Razumevanje nesigurnosti bioprocasa koji se projektuje je veoma bitno za realnu procenu projekta. Stoga, neophodno je identifikovati rizike i mogućnosti unutar bioprocasa i kvantifikovati ih. Tokom modelovanja bioprocasa obično ostaje nekoliko otvorenih pitanja.

Ona naglašavaju potrebu za analizom nesigurnosti. Štaviše, precizna dokumentacija o pretpostavkama donetih tokom modelovanja bioprocasa pomaže u identifikaciji nesigurnih oblasti. Alternativni dijagrami toka bioprocasa mogu se uporediti u analizi različitih scenarija. Uticaj pojedinačnih ulaznih promenljivih, poput cene podloge ili kultivacionog vremena, ispituje se u analizi osetljivosti.

Pri razmatranju termina "nesigurnost", može se napraviti zabuna između varijabilnosti i nesigurnosti. Varijabilnost je unutrašnja odlika sistema. Ona se ne može umanjiti daljim ispitivanjima, iako se može smanjiti podešavanjem bioprocasa. Varijacija prinosa proizvoda od šarže do šaraže u postojećem postrojenju dobar je primer varijabilnosti. Nesigurnost u užem smislu izazvana je usled nedostatka znanja o nekom parametru, odnosno nivou neznanja. Parametar sam po sebi u stvarnosti ne pokazuje varijabilnost, ali njegova tačna vrednost još nije poznata. Dalja istraživanja mogu da smanje ovu vrstu nesigurnosti. Primer za ovo može biti cena sirovine koja će biti fiksna prema dugoročnom ugovoru sa dobavljačem, ali koja još nije dogovorena. Često, varijacija parametara modela uključuje i varijabilnost i nesigurnost. Na primer, očekivani prinos proizvoda krajnjeg bioprocasa uključuje nekoliko nesigurnosti, jer nije poznato kolika srednja vrednost prinosa može biti postignuta. Takođe, postoji varijabilnost u prinosu od šarže do šaraže.

Nesigurnost koja utiče na bioproces uključuje varijaciju u samom bioprocesu, kao i u lancu snabdevanja i tržištu proizvoda (slika 3.10). U lancu snabdevanja cene i kvalitet sirovina, potrošnog materijala i komunalnih usluga može ukazati na varijabilnost. Nesigurnost tržišta obično uključuje prodajnu cenu proizvoda i veličinu tržišta. Nesigurnost samog bioprocasa utiče na strukturu DTB, koja je ispitana u analizi scenarija i na vrednosti tehničkih parametara procedura. Pored razlika u lancu snabdevanja, tehničkim i tržišnim parametrima, može biti korisno napraviti razliku između parametara koji utiču na različite sekcije bioprocasa (npr. priprema, bioreakcija, bioseparacija).



Slika 3.10. Oblasti nesigurnosti koje utiču na bioproces

Pored ovih nesigurnosti, koje direktno utiču na bioproces, postoje nesigurnosti u društvenom i političkom okruženju, gde se realizuje bioproces. Na primer, društvena prihvatljivost ili nove pravne smernice mogu jako da utiču na uspeh bioprocesa, kao što je slučaj sa genetički modifikovanim organizmima u poljoprivredi. Međutim, veoma je teško kvantifikovati, predvideti i ubaciti ove promenljive u model, pa se ne razmatraju u analizi nesigurnosti. Ipak, one se moraju uzeti u obzir i treba ih imati na umu.

Pre početka analize, treba definisati parametre koji će se koristiti kao ciljne funkcije za opis uticaja nesigurnosti. Obično se bira parametar koji opisuje tehnički učinak bioprocesa, npr. godišnja proizvodnja.

4. MATERIЈAL I METODE RADA

4.1. Priprema sirovina i definisanje uslova bioprocasa

4.1.1. Proizvodni mikroorganizmi

Tokom istraživanja iz okvira ovog rada za proizvodnju etanola primenjen je komercijalno dostupan kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u obliku svežeg pekarskog kvasca (Alltech-Serbia, Senta, Srbija). Kako bi se proizvodni mikroorganizam prilagodio uslovima fermentacije, sveži pekarski kvasac je suspendovan u maloj količini hranljive podloge, nakon čega je dodat preostaloj količini hranljive podloge. Kvasac je u prethodno pripremljenu hranljivu podlogu dodavan u količini od 10 g/L (računato kao svež pekarski kvasac sa 30 % suve materije), kako bi početna koncentracija ćelija u hranljivoj podlozi iznosila približno 10^8 cfu/mL.

Za ispitivanje proizvodnje celulolitičkih enzima upotrebljen je referentni soj plesni *Trichoderma reesei* QM 9414 (Departman za biologiju, Univerziteta u Masačusetsu Amherst). Osvežavanje kulture plesni je vršeno na krompir dekstroznom agaru inkubacijom 3-4 dana na 28 °C. Za inokulaciju hranljive podloge pripremljena je suspenzija spora u sterilnom fiziološkom rastvoru koja sadrži 10^6 spora/g. Tečne podloge inokulisane su sa 10 % inokuluma, a čvrste raspršivanjem definisane zapremine pripremljene suspenzije spora po njihovoj površini.

4.1.2. Hranljive podloge i njihova priprema

Za pripremu hranljivih podloga primenjeni su međuproizvodi iz procesa prerade šećerne repe (ekstrakcioni, retki i gusti sok), kao i nusproizvodi pomenute tehnologije (melasa i izluženi repini rezanci). Navedene sirovine dobijene su iz tri domaće fabrike šećera: „Crvenka“ a.d., Crvenka, „TE-TO“ a.d., Senta i „Šajkaška-Hellenic Sugar Industry“ a.d. Žabalj.

Tečni supstrati (ekstrakcioni, retki i gusti sok i melasa) su razblaživani destilovanom vodom i/ili hidrolizatom izluženih repinih rezanaca do postizanja početnog sadržaja šećera u opsegu 11,5-20 % (m/v), s obzirom da su se ove koncentracije pokazale kao optimalne za proizvodnju etanola na pomenutim sirovinama kao hranljivim podlogama (Grahovac, 2011).

Izluženi repini rezanci su pre fermentacije podvrgnuti predtretmanu, odnosno usitnjavanju mlevenjem u laboratorijskom mlinu sa noževima, nakon čega je uzorak prosejan kroz dva sita od 20 mesh (850 μm) i 80 mesh (180 μm). Frakcije koje sadrže čestice manje od 180 μm (-80 mesh), između 180-850 μm (-20/+80 mesh) i veće od 850 μm (+20 mesh) su upotrebljene za ispitivanje uticaja veličine čestica na efikasnost hidrolize.

Predtretman izluženih repinih reznaca izveden je primenom razblažene sumporne kiseline u koncentraciji 1-4 % na temperaturi 121 °C u različitim vremenskim intervalima (30-120 min).

Prevođenje složenih u proste (fermentabilne) šećere u izluženim repinim rezancima ispitano je hidrolizom komercijalno dostupnim enzimskim preparatima (E-CELBA, Megazyme, Irska) i enzimima produkovanim kultivacijom plesni (submerzno u tečnim podlogama ili kultivacijom na čvrstim hranljivim podlogama). U 0,1 M acetatni pufer (pH 5,5) dodata je količina repinih reznaca tako da je dobijen 1 % rastvor. Ovaj rastvor je pomešan sa rastvorom enzimskog preparata ili tečnom fazom fermentacione tečnosti ili ekstraktom čvrste podloge u odnosu 3:1. Nakon homogenizacije, hidroliza je vršena u toku 60 min na 45 °C (Dodić i Grahovac, 2013).

Kultivacija plesni sa ciljem proizvodnje enzima ispitana je različitim tehnikama kultivacije, i to submerzno u tečnim i emerzno na čvrstim hranljivim podlogama. Sastav tečnih podloga za submerznu tehniku kultivacije je bila 1,5 % usitnjenih izluženih repinih reznaca, 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 1,36 % K_2HPO_4 u destilovanoj vodi. Za emerznu tehniku kultivacije potrebna količina usitnjene sirovine suspendovana je u dvostruko većoj količini česemske vode pa nakon 15 min mešanja proverena i korigovana vrednost pH. Nakon dodatnih 15 min mešanja suspenzija je ostavljena da miruje kako bi se čvrsta faza istaložila u gravitacionom polju. Tečna faza je dekantovana, a talog upotrebljen kao čvrsta podloga za proizvodnju enzima.

Vrednost pH primenjenih hranljivih podloga za proizvodnju etanola je korigovana na $5,0 \pm 0,2$ dodatkom 10 % (v/v) sumporne kiseline, a podloga za sintezu enzima na $4,5 \pm 0,1$ primenom 1 % NaOH ili 1 % H_2SO_4 . Sterilizacija pripremljenih hranljivih podloga je izvedena u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i pritisku od 2,1 bar u trajanju od 30 min.

4.1.3. Uslovi fermentacije

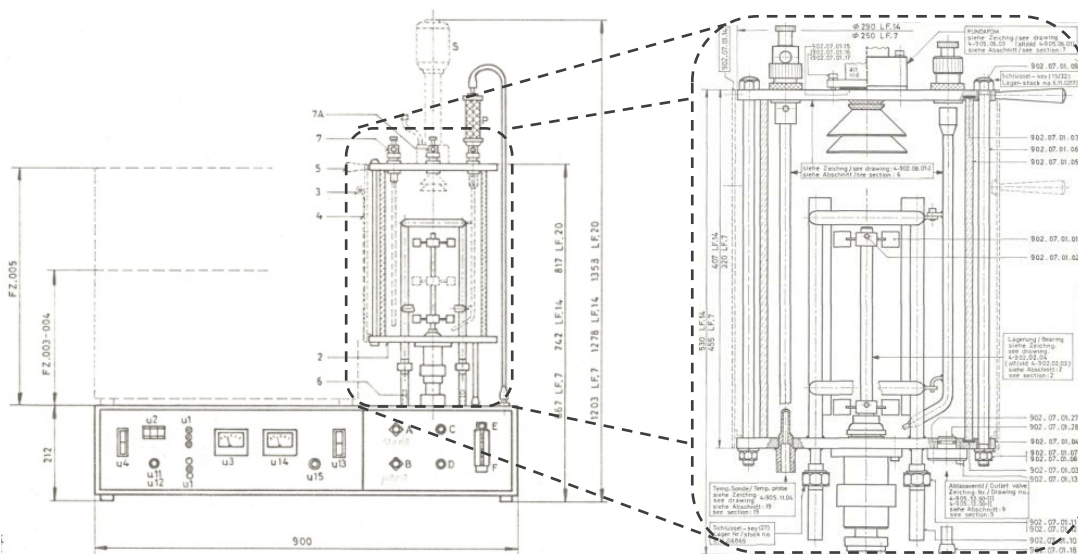
Eksperimenti sa ciljem ispitivanja toka i optimizacije uslova fermentacije izluženih repinih reznaca i smeše hidrolizata izluženih repinih reznaca i međuproizvoda prerade šećerne repe su izvedeni u laboratorijskom bioreaktoru (*Woulff*-ova boca) ukupne zapremine 2 L (radna zapremina 1,2 L). Bioreaktor je opremljen nastavkom ispunjenim sterilnim parafinskim uljem, koji obezbeđuje anaerobne uslove, omogućava otpuštanje nastalog CO_2 , a sprečava kontaminaciju i gubitke etanola isparavanjem. Fermentacija hranljive podloge u trajanju od 48 h, uključujući i vreme potrebno za suspendovanje inokuluma, je izvedena šaržnim postupkom pod anaerobnim uslovima, pri temperaturi od 28 °C i brzini mešanja 200 o/min, koja je obezbeđena postavljanjem bioreaktora na mikrobiološku laboratorijsku tresilicu u termostatu.

Provera (validacija) rezultata optimizacije obavljena je dodatnom serijom eksperimenata u laboratorijskom bioreaktoru (BIOSTAT A-Plus, Sartorius AG, Goettingen, Germany) ukupne zapremine 3 L (radne zapremine 2 L) sa automatskim merenjem i regulacijom procesnih parametara (slika 4.1).



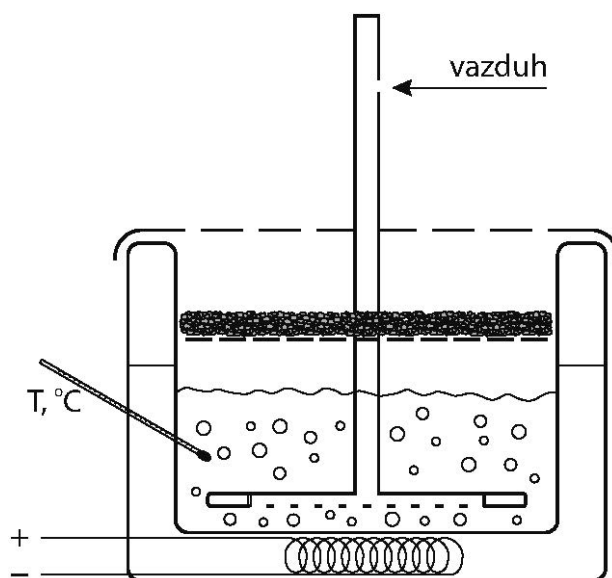
Slika 4.1. Laboratorijski bioreaktor BIOSTAT A-Plus

Fermentacije hranljive podloge, sa ciljem ispitivanja kinetike toka fermentacije pri definisanim optimalnim uslovima, izvedene su u uvećanoj razmeri u laboratorijskom bioreaktoru (Chemap AG, CH-8708, Männedorf, Switzerland) ukupne zapremine 14 L (radne zapremine 10 L) pri anaerobnim uslovima i temperaturi od 28 °C (interna regulacija temperature). Brzina mešanja od 150 o/min je obezbeđena mešanjem pomoću dve *Rushton*-ove turbine i 4 odbojnika (slika 4.2). Vreme fermentacije u definisanom trajanju od 48 h je mereno od momenta inokulacije hranljive podloge.



Slika 4.2. Laboratorijski bioreaktor Chemap AG

Proizvodnja enzima submerznom tehnikom kultivacije plesni ispitana je u erlenmajerima od 300 mL sa 100 mL hranjive podloge. Za mešanje kultivacione tečnosti korišćena je rotaciona tresilica pri 150 o/min. Kultivacija plesni na čvrstim hranljivim podlogama izvedena je u *solid state* bioreaktoru prikazanom na slici 4.3. Inokulisana čvrsta hranljiva podloga smeštena na perforiranu površinu, aerisana je, a ujedno i vlažena, prodivavanjem vazduha kroz destilovanu vodu smeštenu ispod perforacija. Regulacija temperature vršena je zagrevanjem destilovane vode preko grejača koji je smešten u omotač suda. Svi ogledi proizvodnje enzima izvedeni su u trajanju od 7 dana na temperaturi od 28 ± 1 °C.



Slika 4.3. Laboratorijski *solid state* bioreaktor

4.2. Analitički postupci

4.2.1. Analiza kvaliteta sirovina

Analiza primenjenih sirovina je izvršena u skladu sa uobičajenom praksom laboratorijske kontrole Nacionalne laboratorije obnovljive energije u Vašingtonu, Amerika (*National Renewable Energy Laboratory* – NREL/TP-510-48087, 2010).

Sadržaj suve materije (SM) primenjenih sirovina određene je gravimetrijski (NREL/TP-510-42621, 2008).

Sadržaj ugljenih hidrata (celuloze, hemiceluloze, saharoze i drugih redukujućih šećera) i lignina određene je primenom visokopritisne tečne hromatografije (HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*) i spektrofotometrijski, redosledom (NREL/TP-510-42618, 2010).

Sadržaj pepela određen je gravimetrijskom metodom (NREL/TP-51-42622, 2008).

Sadržaj ukupnog azota u primenjenim sirovinama je određivan metodom po *Kjeldahl*-u (NREL/TP-510-42625).

Sadržaj ekstrakata određen je vodenom i alkoholnom ekstrakcijom (NREL/TP-510-42619, 2008).

4.2.2. Analiza uzoraka fermentacione tečnosti

Uzorci kultivacione tečnosti su radi potrebnih analiza uzimani u sterilnim uslovima u definisanim vremenskim intervalima.

Sadržaj biomase u kultivacionoj tečnosti (g/mL) je određivan spektrofotometrijski pomoću prethodno definisane zavisnosti apsorbance u funkciji suve materije model rastvora poznatog sadržaja biomase kvasca. Suva materija model rastvora određena je sušenjem taloga koji je izdvojen centrifugiranjem 10 mL suspenzije u toku 10 min na 3000 o/min (Tehtnica LC-321, Železniki), na 105 °C do konstantne mase. Apsorbanca model rastvora je merena spektrofotometrom (UV Spectrophotometer, UV-1800, Shimadzu, Japan) na 660 nm (Govindaswamy i Vane, 2007), čime su dobijene njene zavisnosti od suve materije model rastvora poznatog sadržaja biomase kvasca. Merenjem apsorbanci uzoraka kultivacione tečnosti na istoj talasnoj dužini i interpolacijom izmerenih vrednosti u prethodno definisanu funkciju indirektno su dobijeni podaci o sadržaju biomase.

Sadržaj suve materije uzoraka je određivan gravimetrijski sušenjem na 105 °C do postizanja konstantne mase (Herlich, 1990).

Uzorci fermentacionih tečnosti su centrifugirani pri 4000 o/min u trajanju od 15 min. Dobijeni supernatanti su filtrirani kroz 0,45 µm najlonske membrane (Agilent Technologies Inc., Germany). Nakon toga je sadržaj ugljenih hidrata (prvenstveno saharoze i redukujućih šećerea) određivan u filtratu pomoću HPLC-a (Thermo scientific Dionex Ultimate 3000 Seires). Instrument HPLC je bio opremljen HPG-3200SD/RS pumpom, WPS-3000(T)SL automatskim uzorkivačem (sa injekcionom petljom od 10 µL), Zorbax-NH₂ kolonom (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) i refraktometrijskim detektorom RefractoMax 520. Kao eluent korišćen je 75 %(v/v) acetonitril protokom od 1,2 mL/min i elucionim vremenom 20 min pri temperaturi kolone od 25 °C.

Sadržaj ukupnog azota u fermentacionim tečnostima je određivan metodom po *Kjeldahl*-u (NREL/TP-510-42625).

Vrednost pH je merena staklenom elektrodom pomoću laboratorijskog multiparametarskog analizatora Consort C863 (Consort, Turnhout, Belgium).

Nakon kultivacije na čvrstim podlogama ekstrahovani su proizvodi metabolizma fiziološkim rastvorom (minimalna količina ekstragensa koja omogućava ekstrakciju uz mešanje, najčešće jednaka zapremini podloge) uz konstantno mešanje pri 200 o/min, u trajanju od 30 min na konstantnoj temperaturi.

Razdvajanje čvrste i tečne faze nakon ekstrakcije iz čvrstih podloga kao i submerzne kultivacije plesni izvršeno je filtracijom kroz kvalitativnu filter hartiju. Dobijeni filtrati podvrgnuti su standardnoj analizi uzoraka fermentacione tečnosti.

Ukupan sadržaj proteina u fermentacionim tečnostima ili ekstraktima čvrste podloge na kraju procesa određivan je spektrofotometrijski metodom po *Lowry*-ju (Dodić i Grahovac, 2013) u kojoj su kao reagensi korišćeni bakar-sulfat u rastvoru alkalnog tartarata i *Folin-Ciocalteu*-ovog rastvora, a apsorbancija je očitavana na 660 nm.

Intenzitet hidrolitičkog delovanja fermentacionih tečnosti i ekstrakata čvrstih podloga prema škrobu, celulozi i ksilanu određen je na osnovu sadržaja redukujućih šećera koji ovim procesom nastaju. Postupak NREL/TP-510-42628 (2008) podrazumeva spektrofotometrijsko određivanje oslobođenih redukujućih šećera metodom po *Miller*-u, a na osnovu toga određivanje aktivnosti produkovanih enzima.

Sadržaj etanola je određivan direktno u uzorcima kultivacione tečnosti gasnom hromatografijom, primenom uređaja HP 5890 Series II GC (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA) opremljenog plameno-jonizujućim detektorom i kolonom Carbowax 20 M, pri 85 °C i sa helijumom kao gasom nosačem. Temperatura injektora i detektora je održavana na 150 °C.

4.2.3. Statistička obrada podataka

Svi rezultati prikazani u ovom radu predstavljaju srednje vrednosti iz tri eksperimenta ponovljena pod istim uslovima. Rezultati su statistički obrađeni analizom varijanse pri stepenu značajnosti $\alpha=0,05$. Adekvatnost modela je procenjena na osnovu koeficijenta determinacije (R^2) i p-vrednosti modela. Metoda funkcije odzivne površine je metoda modelovanja pogodna za proučavanje uticaja više faktora na odzive njihovim istovremenim variranjem uz izvođenje ograničenog broja eksperimenata.

Za opis odzivne funkcije Y (ukupan sadržaj redukujućih šećera (% m/v) i sadržaj etanola (% v/v)), primenjen je polinom drugog reda:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}^2X_1^2 + b_{22}^2X_2^2 + b_{33}^2X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

gde su: b_0 - odsečak,

b_1 , b_2 i b_3 - linearni koeficijenti,

b_{11} , b_{22} i b_{33} - kvadratni koeficijenti i

b_{12} , b_{13} i b_{23} - koeficijent interakcije.

Ispitivan je uticaj sledećih faktora u navedenim opsezima:

X_1 : veličina čestica (180-850 μm)

X_2 : koncentracija sumporne kiseline (1-4 %v/v) i

X_3 : trajanje predtretmana (30-120 min).

Statistička obrada eksperimentalnih podataka i crtanje površina odziva je urađeno primenom softverskog paketa STATISTICA 12.0 (StatSoft, USA). Značajnost uticaja svakog od faktora kao i njihovih interakcija određivana je poređenjem t-vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Za optimizaciju faktora, primenjena je metoda željene (tražene) funkcije u softverskom paketu DESIGN-EXPERT 7.0 (StatEase, Inc., USA).

4.2.4. Kinetički modeli i proračun kinetičkih parametara

Pored široko primenjivanog *Monod*-ovog modela, logistička jednačina se sve više koristi za opis mikrobiološkog rasta mnogih različitih bioloških sistema, kao i za predviđanje inhibicije i inaktivacije tokom rasta (Wachenheim i sar., 2003). Ovaj model se služi samo brojem mikroorganizama i ne uključuje potrošnju supstrata kao što bi to zahtevao model zasnovan na *Monod*-ovoj jednačini. Količina supstrata u ovom slučaju je nebitna, jer se pretpostavlja da je ima dovoljno za dobijanje neograničene količine mikroorganizama (Pazouki i sar., 2008; Mu i sar., 2006; Sharifzadeh Baei i sar., 2008). Stoga je logistička jednačina upotrebljena za modelovanje rasta ćelija kvasca tokom diskontinualnog fermentacionog procesa. Ona je dobijena iz sledeće jednačine:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \cdot X \quad (2)$$

gde su: X – koncentracija biomase (g/L),

X_m – maksimalna ostvarljiva koncentracija biomase (g/L) i

μ_m – maksimalna specifična brzina rasta.

Primenom graničnih uslova (kada je $t_0 = 0$, onda je $X = X_0$) dobija se sigmoidalna zavisnost koncentracije biomase (X) i vremena (t). Jendačina (2) se lako može integraliti kako bi se dobila logistička jednačina, koja može da se primeni za opis i eksponencijalne i stacionarne faze rasta. Rezultujuća jednačina ima sledeći oblik:

$$X = \frac{X_0 \cdot \exp(\mu_m \cdot t)}{1 - (X_0 / X_m) \cdot (1 - \exp(\mu_m \cdot t))} \quad (3)$$

Ovim modelom je izvršena provera vrednosti X_0 , X_m i μ_m . Logistička jednačina, prikazana gore, ne odgovara fazi odumiranja mikroorganizama nakon stacionarne faze rasta.

U ovoj disertaciji, ciljani proizvod iz fermentacije među- i/ili nusproizvoda prerade šećerne repe je bio etanol. Stoga je ispitana i kinetika proizvodnje etanola. Jedan od široko rasprostranjenih modela za nastajanje proizvoda je modifikovan *Gompertz*-ov model, iz kojeg se dobijaju podaci o trajanju lag faze proizvodnje etanola, specifične brzine proizvodnje etanola, i potencijalne maksimalne koncentracije proizvoda. Stoga je ova modifikovana *Gompertz*-ova jednačina iskorišćena za modelovanje produkcije etanola tokom fermentacionog procesa (Van Ginkel i sar., 2001; Arroyo-López i sar., 2009):

$$P = P_m \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{r_{p,m} \cdot \exp(1)}{P_m} \right] \cdot (t_L - t) + 1 \right\} \quad (4)$$

gde su: P – koncentracija etanola (g/L),

P_m – maksimalno moguća koncentracija etanola (g/L),

$r_{p,m}$ – maksimalna brzina proizvodnje etanola (g/L·h) i

t_L – lag faza proizvodnje etanola (h).

Kinetika potrošnje supstrata, odnosno smanjenja koncentracije redukujućih šećera u toku fermentacije, opisana je primenom *Pirt*-ove jednačine, koja predstavlja zavisnost koncentracije supstrata (S) od početne koncentracije supstrata (S_0), prinosa biomase ($Y_{x/s}$), koncentracije biomase (X), početne koncentracije biomase (X_0), koeficijenta održavanja (m), maksimalne koncentracije biomase (X_m) i maksimalne specifične brzine rasta (μ_m). Jednačina ima sledeći oblik:

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot (X - X_0) - \frac{m \cdot X_m}{\mu_m} \cdot \ln \left(\frac{X_m - X_0}{X_m - X} \right) \quad (5)$$

Sva tri modela, logistički, *Gompertz*-ov i *Pirt*-ov, fitovani su u eksperimentalne podatke pomoću nelinearne regresione analize, upotrebom komercijalno dostupnog softvera SigmaPlot®11. Statistički indikator (R^2) za ispravnost regresije je dobijen direktno iz ovog programa.

4.2.5. Generisanje modela i simulacija bioprocasa

Kompjuterske simulacije se uspešno koriste za modelovanje i predviđanje troškova proizvodnje u mnogim industrijskim procesima. Simulacije omogućavaju predviđanje različitih scenarija koji se mogu javiti tokom rada postrojenja poput: uticaja porasta cena sirovina ili komunalnih usluga, varijacije u sastavu sirovina, kao i uvođenje novih tehnologija. Oslanjajući se na osnovni model bioprocasa i definisanjem novih uslova korisnik na efikasan način može sa sigurnošću da utvrdi rezultate alternativnih načina rada postrojenja.

Za generisanje modela bioprocasa proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe upotrebljen je program SuperPro Designer® v9.0 (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ), odnosno program koji omogućava procenu kako procesnih tako i ekonomskih parametara datog bioprocasa.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

U prvom delu ovog poglavlja su prikazani rezultati analize sastava nusproizvoda tehnologije prerade šećerne repe (izluženih repinih reznaca) iz tri domaće fabrike šećera, koji je primenjen kao sirovina tokom istraživanja iz okvira ovog rada. U drugom delu su prikazana istraživanja sa ciljem utvrđivanja optimalnih uslova predtretmana lignocelulozne sirovine. Na osnovu pokazatelja procesa predtretmana, definisani su značajni faktori koji su uključeni u modelovanje odabranih odziva: ukupan sadržaj redukujućih šećera nakon hidrolize i sadržaj etanola nakon fermentacije. Potom su prikazani rezultati primene metode željene funkcije u kombinaciji sa polinomskim zavisnostima posmatranih odziva za optimizaciju veličine čestica, koncentracije kiseline i vremena trajanja predtretmana. Treći deo ovog poglavlja je posvećen proveru validnosti dobijenih rezultata, odnosno njihove primenjivosti u uvećanim razmerama, kao i utvrđivanju kinetike rasta proizvodnog mikroorganizma, kinetike potrošnje limitirajućeg supstrata i kinetike dobijanja etanola kao željenog proizvoda u procesu fermentacije ekstrakcionog, retkog i gustog soka, melase i izluženih repinih reznaca. Na osnovu dobijenih kinetičkih modela i literaturnih podataka u poslednjem delu ovog poglavlja dato je rešenje modela postrojenja za proizvodnju etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe.

5.1. Sastav sirovina

U proizvodnji šećera, šećerna repa se, kao što je opisano u literaturnom pregledu, šeće na sitnije komade iz kojih se vrši ekstrakcija saharoze. Dobijeni ekstrakcioni sok se dalje prerađuje do konačnog proizvoda (šećera) pri čemu zaostaje melasa kao jedan od nusproizvoda ove tehnologije. Sa druge strane, ostaci šećerne repe nakon ekstrakcije, odnosno izluženi repini rezanci imaju visok sadržaj vode (80-90 %), što je glavni nedostatak po pitanju njihovog transporta i skladištenja (Kühnel i sar., 2011). Presovanjem se može ukloniti višak vode iz izluženih repinih reznaca. Ovako tretirani izluženi repini rezanci su pogodniji za transport ali su njihove karakteristike po pitanju skladištenja i dalje loše (maksimum dve nedelje). Za duže periode skladištenja izluženi repini rezanci se moraju sušiti (sadržaj suve materije oko 90 %).

Sastav među- i nusproizvoda prerade šećerne repe zavisi od lokaliteta i vrste zemljišta na kojem se ova kultura gaji, kao i od primenjenog tehnološkog postupka (van der Poel i sar., 1998). Rezultati analize sastava izluženih repinih rezanaca iz tri domaće fabrike: „Crvenka“ a.d., Crvenka, „TE-TO“ a.d., Senta i „Šajkaška-Hellenic Sugar Industry“ a.d., Žabalj, prikazani su u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Prosečan sastav svežih i suvih izluženih repinih rezanaca iz domaćih fabrika šećera

	Izluženi repini rezanci							
	Sveži				Suvi			
	SV	SD	Min	Max	SV	SD	Min	Max
SM (% m/m)	24,1	1,8	19,2	27,8	89,2	1,3	84,3	93,0
Celuloza (% SM)	23,0	1,2	20,7	23,7	21,7	0,4	19,7	22,4
Hemiceluloza (% SM)	24,5	1,8	26,0	30,0	24,0	2,2	18,1	28,2
Šećeri (% SM)	5,1	1,9	1,2	9,5	7,6	2,5	1,4	14,3
Lignin (% SM)	1,8	0,2	1,7	2,0	2,4	0,8	1,2	4,5
Proteini (% SM)	8,6	0,6	7,6	10,2	9,3	0,9	7,4	13,3
Pepeo (% SM)	6,8	1,3	4,7	10,4	7,7	1,6	3,9	14,5
Ekstrakti (% SM)	0,5	0,2	0,2	0,8	0,9	0,3	0,4	1,7

SM – suva materija; SV – srednja vrednost; SD – standardna devijacija

Prilično visok sadržaj redukujućih šećera (saharoze, glukoze, fruktoze, i dr.) u repinim rezancima nakon ekstrakcije istih ukazuje na velike gubitke u proizvodnji šećera, odnosno zastarelost tehnologije u domaćim fabrikama šećera. S obzirom da se sadržaj šećera u šećernoj repi kreće u opsegu 14-20 % (Grahovac, 2011), evidentna je nepotpuna iskorišćenost sirovine tokom njene prerade sa ciljem proizvodnje šećera. Prisustvo lignina, sa druge strane, uz kristalnu strukturu celuloze čini lignocelulozne materijale otpornim na enzimsku hidrolizu i predstavlja jedan od glavnih problema u proizvodnji etanola iz ovih sirovina (Hendriks i Zeeman, 2009). Štaviše, lignin izaziva neproduktivno vezivanje celulolitičkih enzima što smanjuje brzinu hidrolize (Börjesson i sar., 2007). Međutim, nizak sadržaj lignina (1-5 %) uz visok sadržaj ugljenih hidrata (celuloze 20-24 %, hemiceluloze 18-30 % i redukujućih šećera 1,2-15 %) čini izlužene repine rezance veoma pogodnom sirovinom za proizvodnju biogoriva i bioproizvoda putem enzimske hidrolize i naknadne mikrobne fermentacije.

Sastav međuproizvoda (ekstrakcionog, retkog i gustog soka) i nusproizvoda (melase) iz tri navedene domaće fabrike šećera, dat je u tabeli 5.2. Prosečan sastav pomenutih sirovina slaže se sa prethodno objavljenim rezultatima (Grahovac, 2011) i uobičajen je za naše podneblje.

Tabela 5.2. Prosečan sastav međuproizvoda fabrike šećera i melase kao nusproizvoda

	ES	RS	GS	M
SM (% m/m)	14,48	13,57	63,95	81,98
Saharoza (% m/m)	12,52	12,35	57,21	50,06
Pepeo	0,32	0,32	2,09	9,96
Ukupan azot (% m/m)	0,11	0,10	0,17	1,86

ES – ekstrakcioni sok; RS – retki sok; GS – gusti sok; M - melasa

Rezultati analize sastava izluženih repinih rezanaca, ekstrakcionog, retkog i gustog soka i melase ukazuju da su navedeni među- i nusproizvodi prerade šećerne repe uobičajenog sastava za proces prerade u domaćim šećerana. Navedeni supstrati, na osnovu svog sastava, predstavljaju pogodnu sirovinu za pripremu hranljive podloge za proizvodnju etanola.

5.2. Optimizacija predtretmana izluženih repinih rezanaca

Predtretmanom, kao jednim od najbitnijih koraka u proizvodnji etanola iz biomase, narušava se njena otpornost i time ona čini podložnijom degradaciji i enzimskoj hidrolizi, tokom koje se lignocelulozne sirovina razara do fermentabilnih šećera (Guragain i sar., 2011). Upravo na ovaj predtretman utiče nekoliko faktora. U ovom radu kao faktori koji utiču na efikasnost hidrolize i naknadne fermentacije ispitani su: veličina čestica izluženih repinih rezanaca, koncentracija kiseline i vreme trajanja predtretmana.

Kao odzivi koji će biti obuhvaćeni daljim modelovanjem, definisani su ukupan sadržaj redukujućih šećera i sadržaj etanola sa ciljem da dobijeni modeli doprinesu boljem razumevanju uticaja različitih veličina čestica, koncentracija kiseline i vremena predtretmana, kao i međusobnih interakcija ovih varijabli na predtretman sirovine, odnosno izluženih repinih rezanaca.

Krajnji cilj primene metode funkcije odzivne površine je optimizacija posmatranog procesa. Za optimizaciju procesa sa dva ili više odziva moguće je primeniti više optimizacionih postupaka, ali je jedna od najčešće primenjivanih metoda upravo metoda željene (tražene) funkcije (Khayet i sar., 2008). Primenom ove metode rešavaju se nelinearni problemi sa ograničenjima, koja se odnose na odabrani opseg eksperimentalnih promenljivih. Problem ovog tipa može se rešiti primenom modifikovanog *Harrington*-ovog pristupa željene funkcije u kombinaciji sa polinomskim zavisnostima posmatranih odziva (Jokić, 2010).

Za opis odzivnih funkcija ukupnog sadržaja redukujućih šećera (% m/v) i sadržaja etanola (% v/v), ispitivan je uticaj sledećih faktora u navedenim opsezima:

X_1 : veličina čestica (180-850 μm)

X_2 : koncentracija sumporne kiseline (1-4 %v/v) i

X_3 : trajanje predtretmana (30-120 min).

Rezultati fitovanja odabranih odziva polinomom drugog reda su prikazani u tabelama 5.3 i 5.4.

Tabela 5.3. Koeficijenti regresione jednačine modelovanih odziva za predtretman izluženih repinih rezanaca

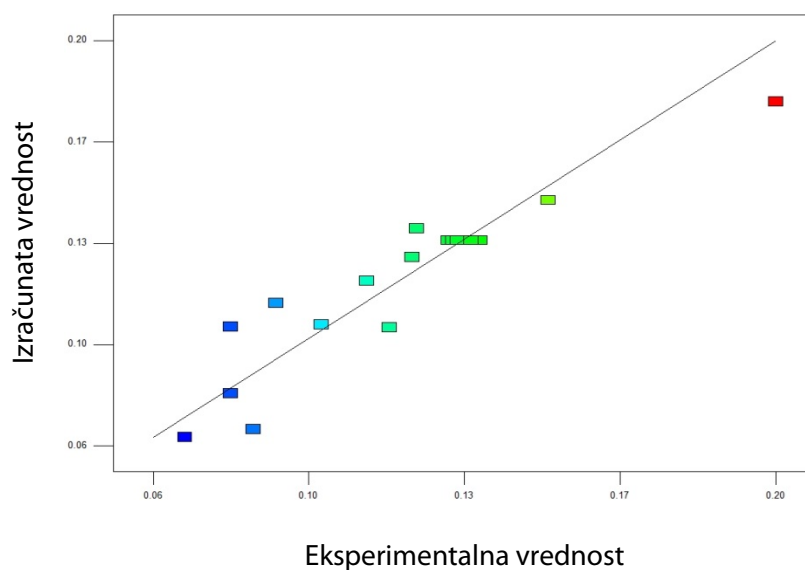
Efekti	Ukupan sadržaj redukujućih šećera (% m/v)	Sadržaj etanola (% v/v)
Odsečak		
b_0	0,013	0,061
Linearni		
b_1	0,002625	0,00125
b_2	0,015	0,00650
b_3	0,024	0,011
Kvadratni		
b_{11}	-0,038	-0,018
b_{22}	0,011	0,004575
b_{33}	-0,004375	-0,002425
Interakcije		
b_{12}	0,014	0,00725
b_{13}	0,00125	0,00125
b_{23}	0,0025	0,00025

U tabeli 5.4 su prikazani rezultati analize varijanse modelovanih odziva za predtretman izluženih repinih rezanaca. Relativno visoke vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) ukazuju na adekvatno fitovanje eksperimentalnih rezultata polinomom drugog reda. Modeli polinoma drugog reda svih posmatranih odziva su značajni pri nivou značajnosti 95 % što potvrđuju F-vrednosti od 85,89 i 21,79 za ukupan sadržaj redukujućih šećera i sadržaj etanola, redosledom. Grafici koji prikazuju poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti i vrednost predviđenih modelom su prikazani na slikama 5.1 i 5.2.

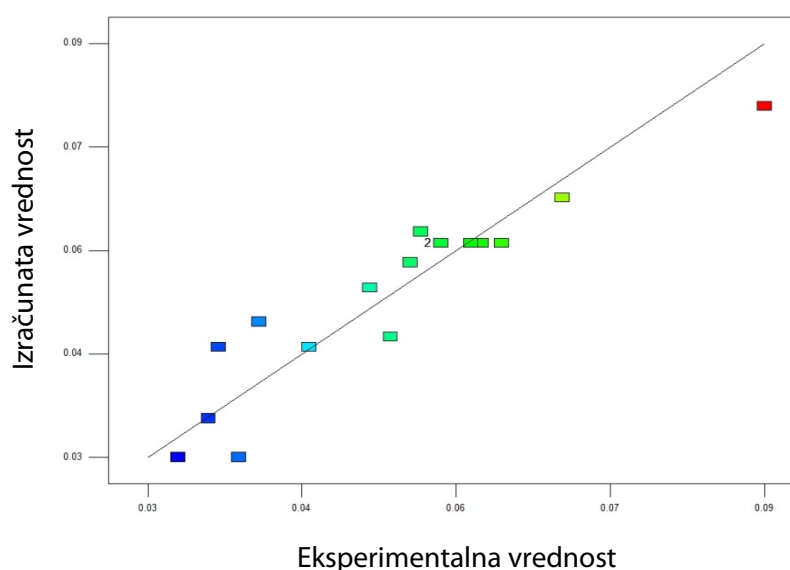
Tabela 5.4. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za predtretman izluženih repinih rezanaca

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	DF	SS	MS	DF	SS	MS	F	p-vrednost	R ²
USRS	7	0,002224	0,0007301	9	0,014	0,001536	85,89	<0,0001	0,891
SE	7	0,000471	0,0000673	9	0,003031	0,000336	21,79	<0,0001	0,905

USRS – ukupan sadržaj redukujućih šećera; SE – sadržaj etanola; DF – stepen slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrata

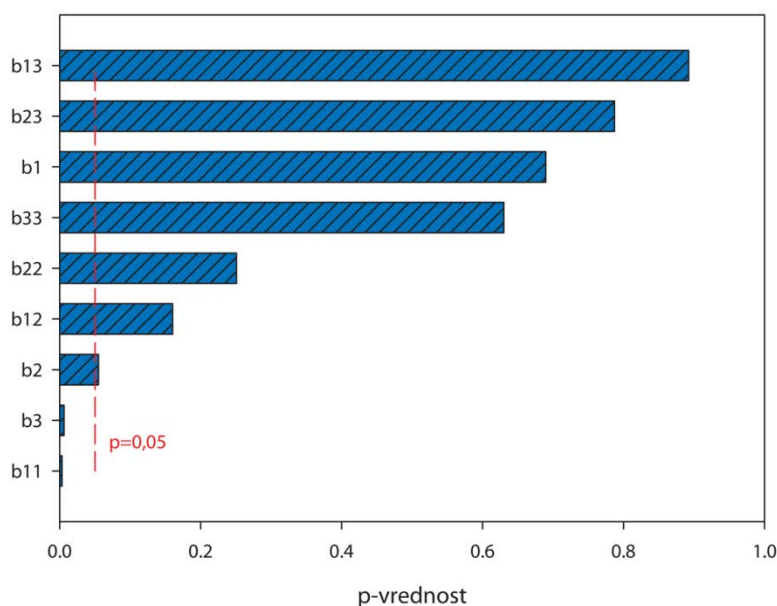


Slika 5.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti ukupnog sadržaja šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca i vrednosti predviđenih modelom



Slika 5.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti sadržaja etanola tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca i vrednosti predviđenih modelom

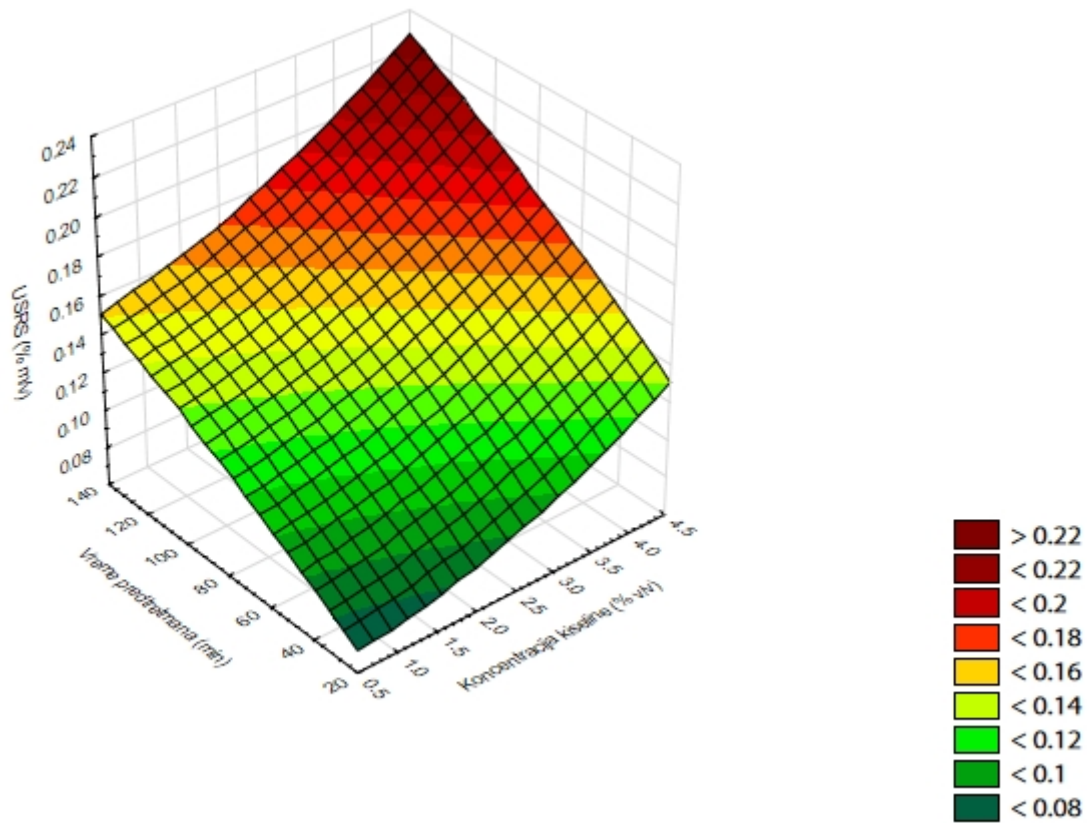
Promena ukupnog sadržaja redukujućih šećera tokom predtretmana fituje se sa koeficijentom determinacije od 0,891 što ukazuje da 10,9 % varijacija nije moglo biti objašnjeno modelom. Individualni efekti odabranih faktora i njihovih interakcija se mogu prodiskutovati na osnovu grafika prikazanog na slici 5.3. Efekti svih parametara, njihovih interackija kao i kvadratnih članova su standardizovani. Redosled prikaza odgovara veličini njihovog uticaja. Vertikalna linija ukazuje na statističku značajnost koeficijenata pri novou značajnosti od 95 %. To znači da je efekat značajan ukoliko je p-vrednost manja od 0,05 u datom eksperimentalnom planu. Posmatrajući grafik na slici 5.3 uočava se da nisu svi efekti značajni. Značajni su samo kvadranti član veličine čestica i linearni član trajanja predtretmana.



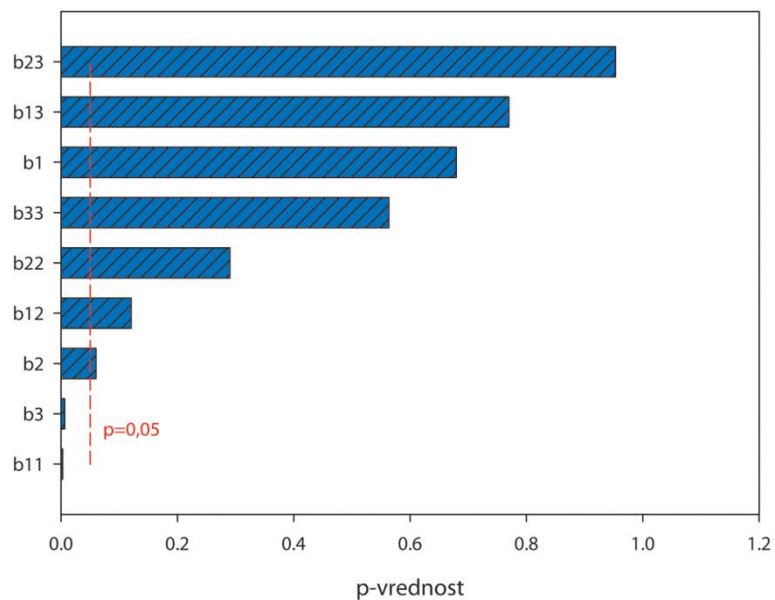
Slika 5.3. Grafik standardizovanih efekata na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih reznaca

Na slici 5.4 je modelom predviđen uticaj koncentracije sumporne kiseline i vremena trajanja predtretmana na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana čestica veličine od 180 μm do 850 μm . Za ovaj opseg veličina čestica jasno se uočava porast ukupnog sadržaja redukujućih šećera sa porastom vremena trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline. Maksimalna koncentracija redukujućih šećera u vrednosti preko 0,2 % (m/v) predviđena je modelom za vrednosti vremena predtretmana i koncentracije kiseline iznad 120 min i 4 % (v/v), redosledom.

Fitovanje rezultata promene sadržaja etanola je nešto bolje budući da koeficijent determinacije od 0,905 ukazuje na svega 9,5 % varijacija nije moglo biti objašnjeno modelom. Na osnovu grafika standardizovanih efekata na sadržaj etanola (slika 5.5) može se zapaziti da jedini efekat na odziv ponovo imaju kvadratni član veličine čestica i linearni član trajanja predtretmana. Ostali članovi nisu statistički značajni pri nivou značajnosti od 95 %.

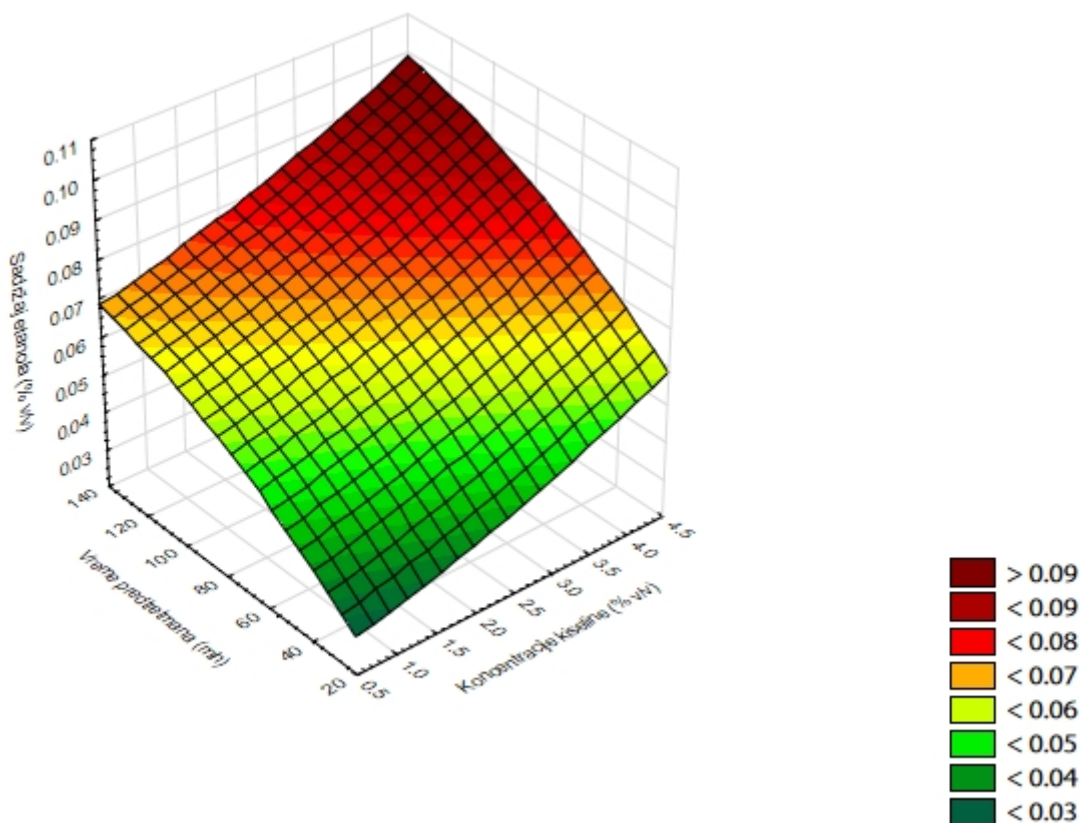


Slika 5.4. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine 180-850 μm



Slika 5.5. Grafik standardizovanih efekata na sadržaj etanola

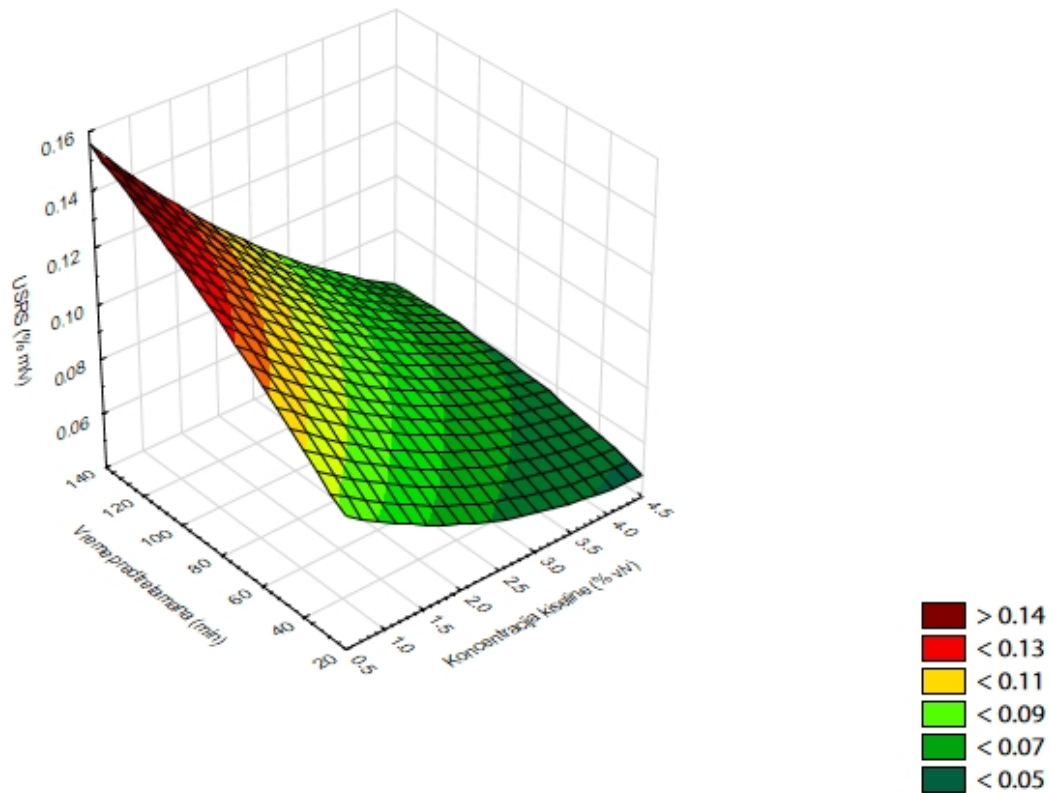
Na slici 5.6 se vidi uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola kako ga predviđa model. Jasno se vidi gotovo porast sadržaja etanola sa porastom trajanja predtretmana i koncentracije kiseline. Maksimalan sadržaj etanola preko 0,9 % (v/v) je modelom predviđen za vreme predtretmana preko 120 min i koncentraciju kiseline preko 4 % (v/v).



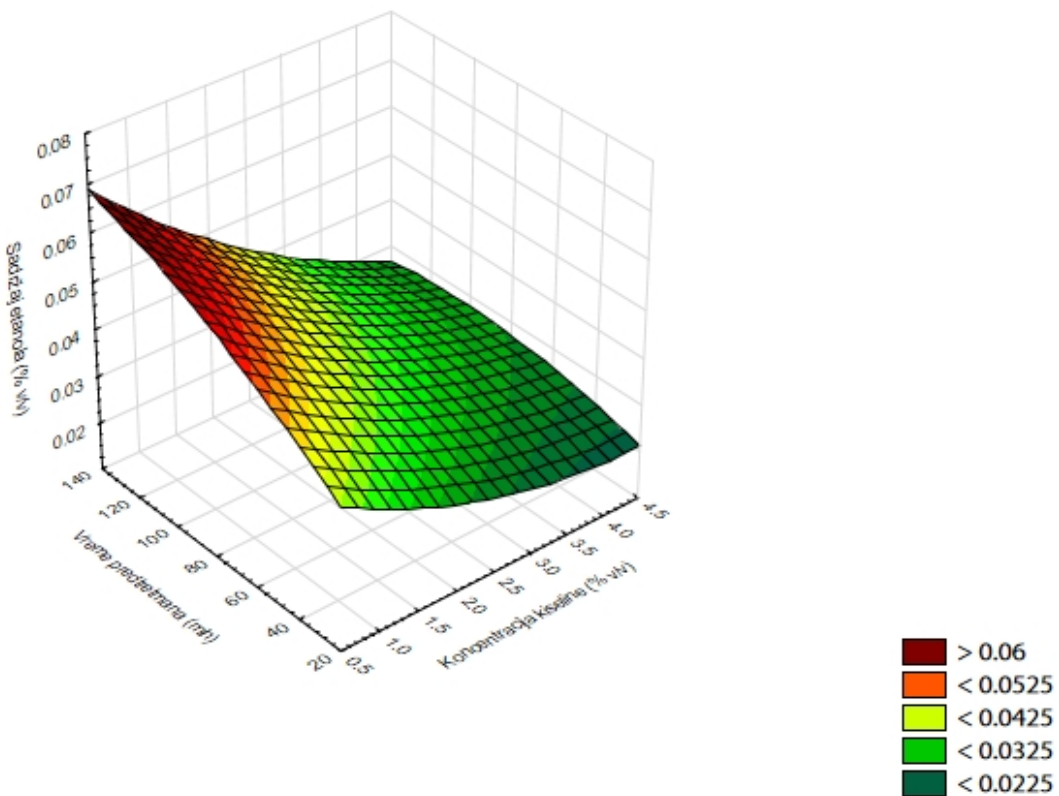
Slika 5.6. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola pri predtretmanu izluženih repinih rezanaca veličine 180-850 μm

Na slici 5.7 je prikazan modelom predviđen uticaj trajanja predtretmana i koncentracije kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine čestica manjih od 180 μm . Može se zapaziti da se vrednosti odziva smanjuju sa porastom koncentracije sumporne kiseline i smanjenjem vremena predtretmana. Upotrebom sitnijih čestica dolazi do degradacije oslobođenih šećera usled dejstva kiseline tokom procesa predtretmana, što na kraju dovodi do manjeg prinosa redukujućih šećera nakon naknadne hidrolize. Maksimalan ukupan sadržaj redukujućih šećera (preko 0,15 % m/v) za ovu veličinu čestica se postiže pri koncentracijama sumporne kiseline oko 1 % (v/v) i vremenom predtretmana od preko 120 min.

Isti zaključak se može izvesti i za uticaj vremena predtretmana i koncentracije kiseline na sadržaj etanola (slika 5.8), samo je trend smanjenja nešto blaži u odnosu na ukupan sadržaj redukujućih šećera. Maksimalan sadržaj etanola (preko 0,06 % v/v) se postiže pri istim vrednostima ispitanih faktora kao i kod ukupnog sadržaja redukujućih šećera.

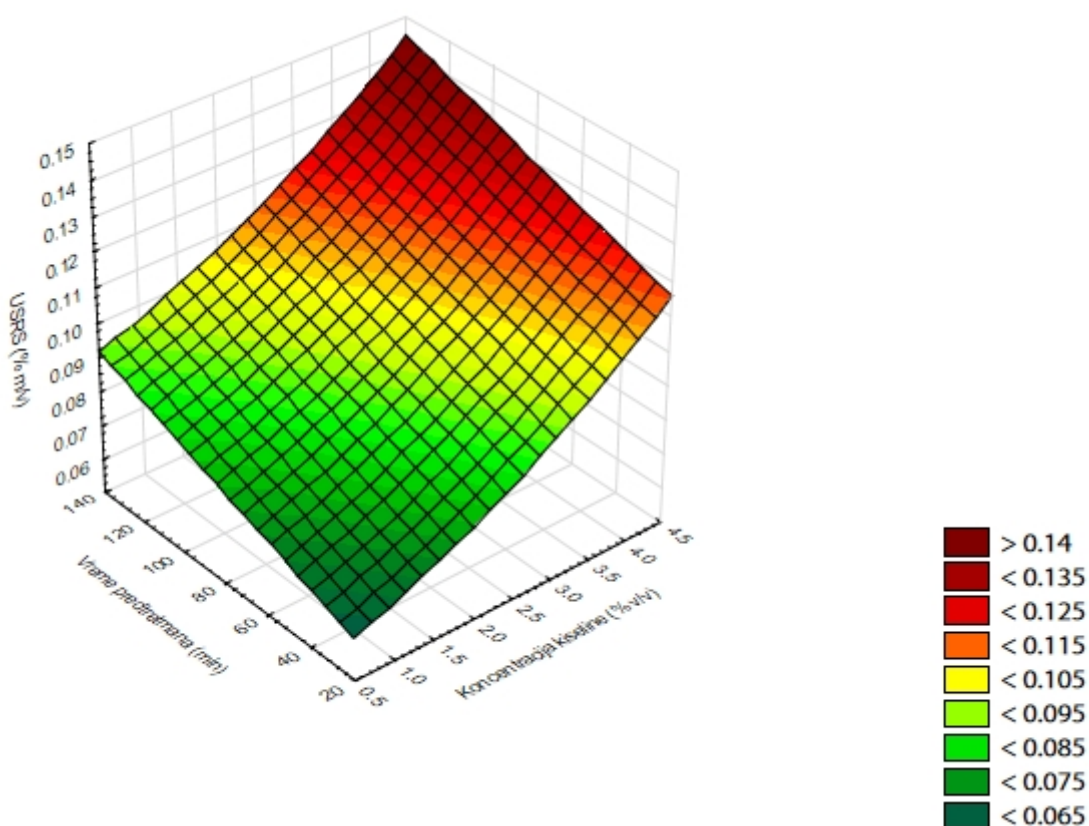


Slika 5.7. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine $<180\ \mu\text{m}$



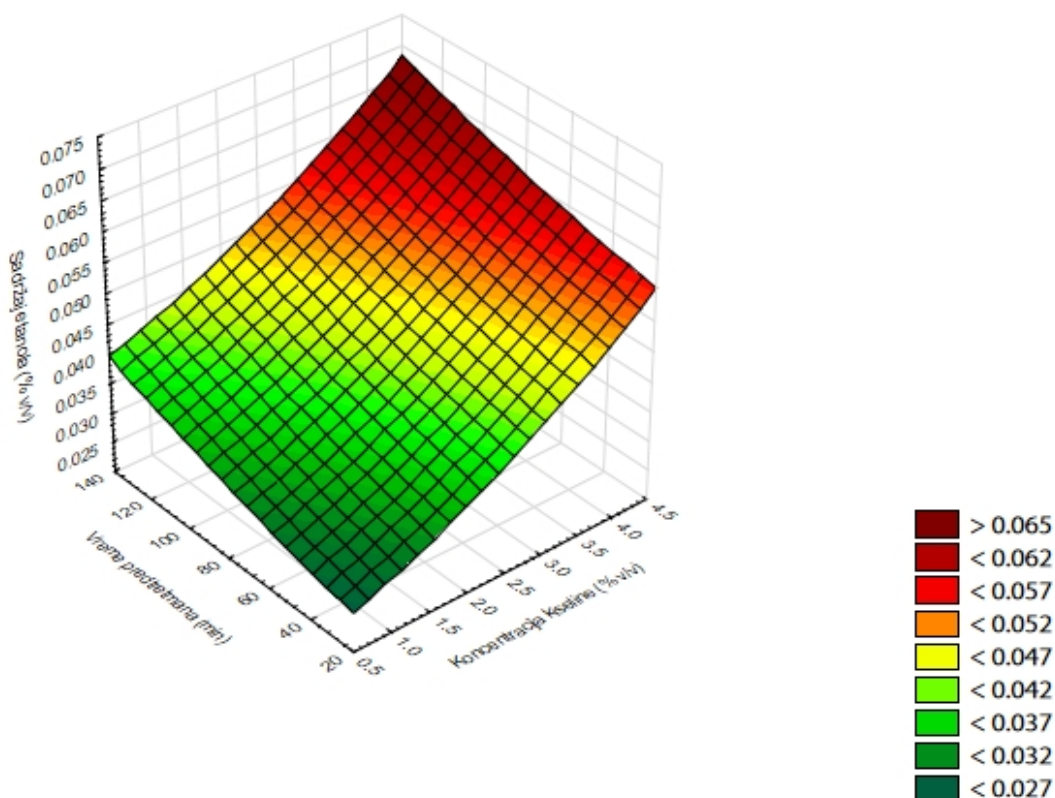
Slika 5.8. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola pri predtretmanu izluženih repinih rezanaca veličine $<180\ \mu\text{m}$

Slike 5.9 i 5.10 prikazuju uticaj vremena trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera i sadržaj etanola, redosledom, za predtretman izluženih repinih rezanaca veličine čestica većih od 850 μm . Može se uočiti da sa porastom koncentracije kiseline i vremena predtretmana raste i ukupan sadržaj redukujućih šećera i sadržaj etanola. Međutim, u ispitanoj opsegu faktora koji utiču na predtretman odzivi ne dostižu maksimalne vrednosti poput onih kao kod veličine čestica izluženih repinih rezanaca od 180 do 850 μm . Ovo može biti posledica nedovoljne izloženosti sirovine uticaju kiseline, što smanjuje efekat njenog predtretmana, a tako i na efikasnost naknadne hidrolize. Maksimalne vrednosti ukupnog sadržaja redukujućih šećera i sadržaja etanola za ovu veličinu čestica pri maksimalnim vrednostima ispitanih faktora iznose 0,14 % (m/v) i 0,065 % (v/v), redosledom.



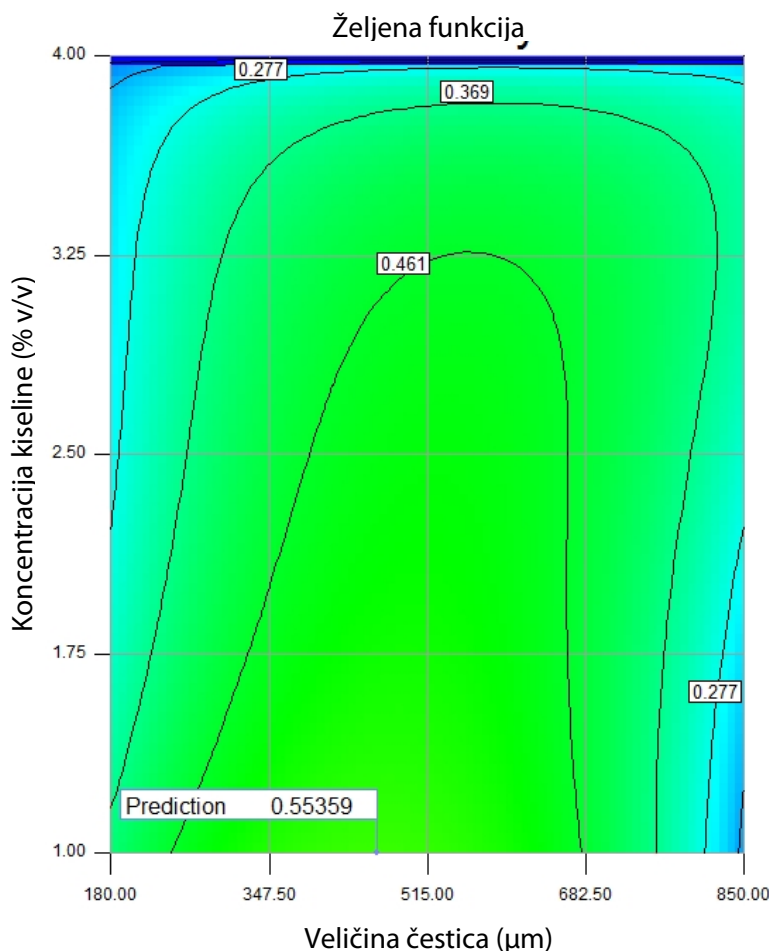
Slika 5.9. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na ukupan sadržaj redukujućih šećera tokom predtretmana izluženih repinih rezanaca veličine $>850 \mu\text{m}$

Za definisanje optimalnog vremena trajanja predtretmana, koncentracije sumporne kiseline i veličine čestica izluženih repinih rezanaca tokom njihovog predtretmana primenjena je metoda željene funkcije. Ova metoda je jedna od najšire primenjivanih metoda u nauci i inženjerstvu za optimizaciju procesa sa više odziva (Khayet et al., 2008). U ovom radu za optimizaciju predtretmana izluženih repinih rezanaca, odabrani odzivi su ukupan sadržaj redukujućih šećera i sadržaj etanola. S obzirom da pod anaerobnim uslovima kvasci metabolišu proste šećere stvarajući etanol i ugljendioksid, neophodno je postići maksimalno mogući prinos redukujućih šećera predtretmanom biomase i maksimalno mogući prinos etanola u naknadnoj fermentaciji, naravno uz minimalan utrošak hemikalija, energije i vremena.



Slika 5.10. Uticaj trajanja predtretmana i koncentracije sumporne kiseline na sadržaj etanola pri predtretmanu izluženih repinih rezanaca veličine $>850 \mu\text{m}$

Prema navedenom, cilj optimizacije je odabir minimalne koncentracije sumporne kiseline, minimalnog trajanja predtretmana i veličite čestica izluženih repinih rezanaca za koje će odabrani odziv ukupnog sadržaja redukujućih šećera i sadržaja etanola biti maksimalan. Na slici 5.11 su prikazani rezultati optimizacije eksperimentalnih vrednosti koncentracije kiseline, vremena predtretmana i veličine čestica. Najviše vrednosti dobijene su srednjim vrednostima veličine čestica i vremena predtretmana i niskim vrednostima koncentracije sumporne kiseline. Trajanje predtretmana, pri kojem željena funkcija dostiže maksimalnu vrednost od 0,554 se nalazi oko vrednosti 75 min za opseg veličina čestica 180-850 μm , dok koncentracija kiseline je oko vrednosti od 1 % (v/v). Za navedene vrednosti variranih parametara vrednosti optimizovanih odziva su sledeće: ukupan sadržaj redukujućih šećera 0,128 % (m/v) i sadržaj etanola 0,059 % (v/v).



Slika 5.11. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od veličine čestica, koncentracije sumporne kiseline i trajanja predtretmana izluženih repinih rezanaca

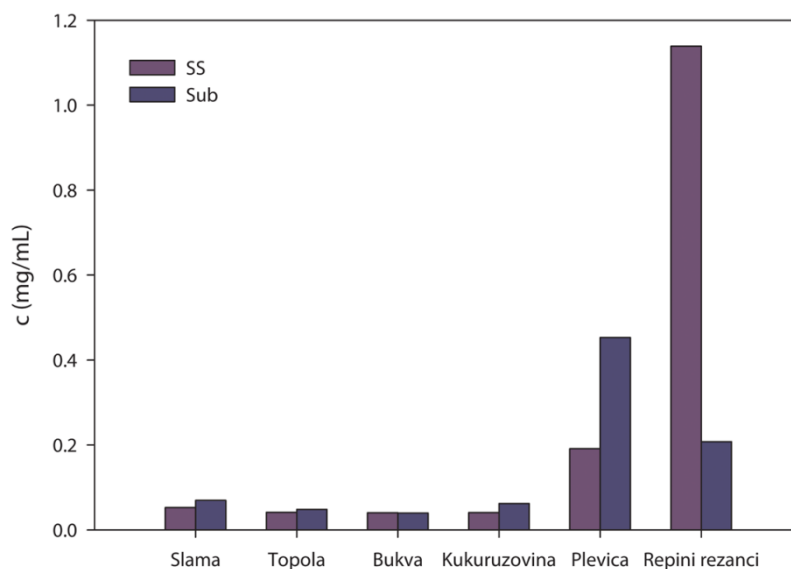
5.3. Ispitivanje proizvodnje enzima

Tok kultivacije plesni *Trichoderma reesei* na različitim celuloznim supstratima je ispitan sa ciljem utvrđivanja mogućnosti proizvodnje enzima iz ovih sirovina, odnosno njihove primene za hidrolizu izluženih repinih rezanaca u procesu proizvodnje etanola.

5.3.1. Proizvodnja enzima na različitim supstratima

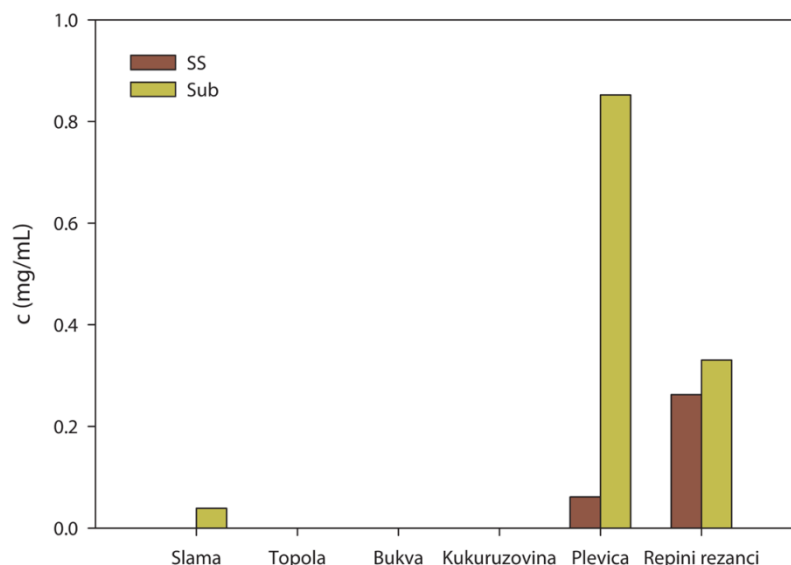
U prvom delu eksperimenata kultivacije plesni ispitana je produktivnost enzima na različitim poljoprivrednim i komunalnim otpadima. Sirovine koje su upotrebljene u ovim ogledima kao hranljiva podloga su bile: slama, piljevina topole, piljevina bukve, kukuruzovina, plevica i izluženi repini rezanci. Kultivacija na ovim hranljivim podlogama izvedena je na dva načina, odnosno dve tehnike kultivacije, i to: submerzno i na čvrstim hranljivim podlogama. Nakon procesa kulti-vacije od 120 h, analizirani su sledeći parametri: sadržaj redukujućih materija, ukupan sadržaj proteina i aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza.

Kultivacijom plesni na lignoceluloznim supstratima, proizvodni mikroorganizam *Trichoderma reesei* za potrebe svog rasta i razmnožavanja sintetiše enzime koje ispušta u podlogu sa ciljem prevođenja složenih u proste (fermentabilne) šećere (Fang i Xia, 2014). U zavisnosti od brzine dejstva enzima i usvajanja prostih šećera od strane proizvodnog mikroorganizma, koncentracija redukujućih šećera u hranljivoj podlozi može da varira. Stoga je analiziran sadržaj redukujućih šećera u filtratima nakon kultivacije ispitanih hranljivih podloga na bazi poljoprivrendih i komulanih otpada (slika 5.12), jer su upravo oni korišćeni za analizu enzimske aktivnosti preko količine oslobođenih redukujućih šećera u standardnim rastvorima složenih ugljenih hidrata (skroba, celuloze i ksilana). Na ovaj način je izbegnuta greška koja bi nastala uvođenjem dodatnih redukujućih šećera u analiziranu smešu za enzimsku aktivnost. Može se uočiti drastično veći sadržaj redukujućih šećera u filtratu čvrste hranljive podloge od izluženih repinih rezanaca. Takođe, sadržaj redukujućih šećera je veći u svim slučajevima kod submerzne tehnike kultivacije, sem u slučaju hranljive podloge na bazi izluženih repinih rezanaca.



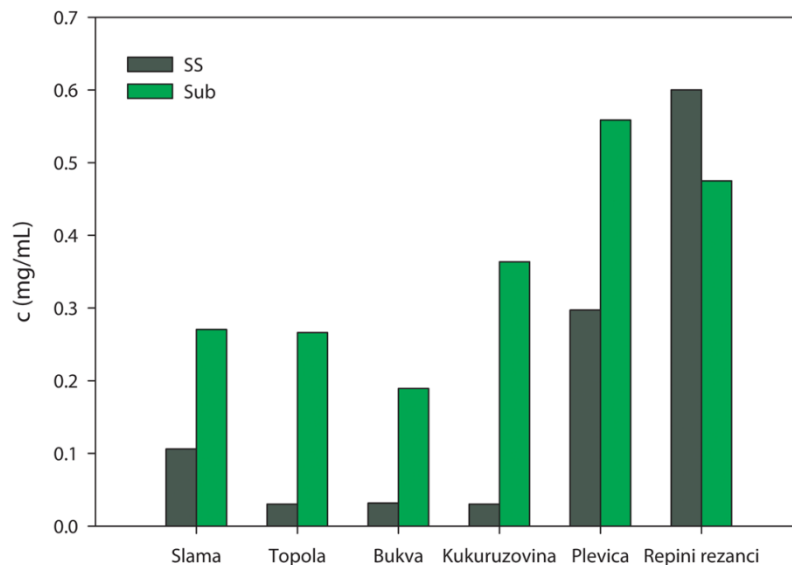
Slika 5.12. Sadržaj redukujućih šećera u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima

Na slici 5.13 su prikazani rezultati analize aktivnosti amilaza (koncentracije oslobođenih redukujućih šećera u standardnom rastvoru skroba) u filtratima dobijenim nakon kultivacije *Trichoderma reesei* na ispitivanim supstratima. Može se uočiti da nakon 120 h kultivacije na hranljivim podlogama na bazi piljevine topole, piljevine bukve i kukuruzovine nema proizvodnje amilaza, kao i u slučaju sumerzne kultivacije slame. U slučaju hranljivih podloga na bazi plevice i izluženih repinih rezanaca uočena je aktivnost amilaza za obe tehnike kultivacije. Najveća enzimaska aktivnost u smislu koncentracije redukujućih šećera nakon hidrolize u standardnom rastvoru skroba uočena je kod filtrata hranljive podloge na bazi plevice, i to za kultivaciju na čvrstim hranljivim podlogama (SS – *solid state*). U svim slučajevima gde postoji enzimaska aktivnost, kultivacija na čvrstim hranljivim podlogama se pokazala kao bolja tehnika za proizvodnju ovog enzima.



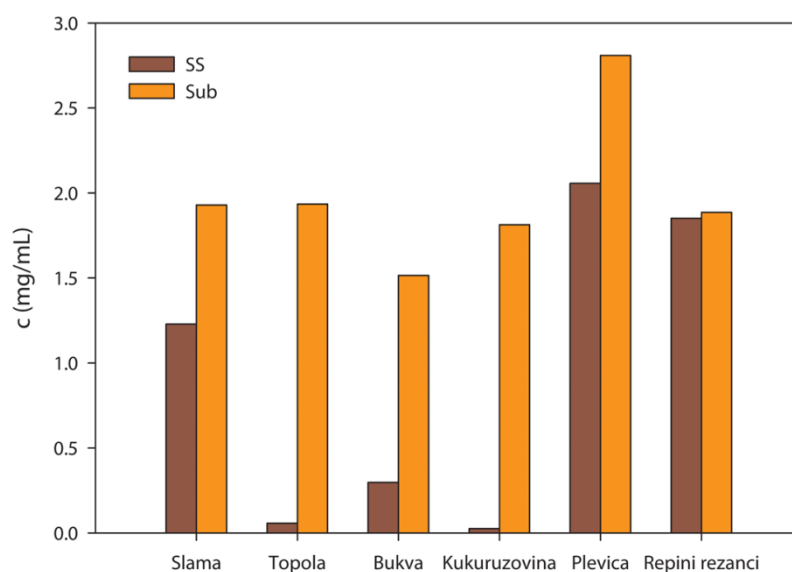
Slika 5.13. Aktivnost amilaza u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima

Slika 5.14 prikazuje rezultate aktivnosti celulaza u filtratima nakon 120 h kultivacije plesni na različitim hranljivim podlogama. Uočena je produkcija celulolitičkih enzima na svih ispitanim hranljivim podlogama i za obe tehnike kultivacije. Proizvodnja datih enzima u submerznim uslovima je dala dobre rezultate u poređenju sa tehnikom kultivacije na čvrstim hranljivim podlogama. Jedino je kod čvrste hranljive podloge od izluženih repinih rezanaca uočena veća aktivnost u poređenju sa submerznom tehnikom kultivacije. Aktivnosti enzima dobijenih na čvrstim hranljivim podlogama na bazi piljevine topole, piljevine bukve i kukuruzovine su drastično manje u poređenju sa onima dobijenim prilikom submerzne kultivacije. Najveća celulolitička aktivnost za submerznu tehniku kultivacije je dobijena na hranljivoj podlozi na bazi plevice. Međutim, izluženi repini rezanci, kao čvrsta hranljiva podloga, pokazali su se za najbolju sirovinu iz koje se kultivacijom plesni *Trichoderma reesei* mogu dobiti celulolitički enzimi najveće aktivnosti, odnosno daju najviše oslobođenih redukujućih šećera u standardnom rastvoru celuloze pod definisanim uslovima.



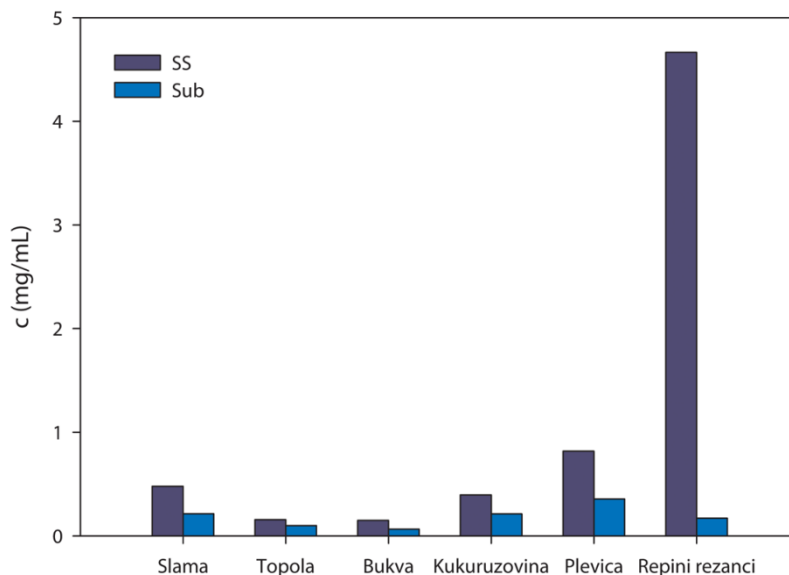
Slika 5.14. Aktivnost celulaza u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima

Rezultati ispitivanja aktivnosti ksilanaza u filtratima nakon kultivacije na različitim hranljivim podlogama na bazi poljoprivrednih i komunalnih otpada, prikazani su na slici 5.15. Analizom sadržaja redukujućih šećera u hidrolizatima standardnih rastvora ksilana pomoću filtrata dobijenih nakon kultivacije plesni na ispitanim supstratima, konstatovano je da je aktivnost ksilanaza u submerznim kulturama veća za sve ispitane hranljive podloge. Kod kultivacije na čvrstim hranljivim podlogama, aktivnost ksilanaza u filtratima piljevine topole i kukuruzovine su drastično manje u odnosu na ostale sirovine. Najveću sposobnost oslobađanja redukujućih šećera u standardnom rastvoru ksilana imao je filtrat dobijen submerznom tehnikom kultivacije hranljive podloge na bazi plevice.



Slika 5.15. Aktivnost ksilanaza u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima

Na slici 5.16 prikazan je ukupan sadržaj proteina u filtratima dobijenim nakon kultivacije *Trichoderma reesei* na ispitanim hranljivim podlogama. Može se uočiti drastično veći (skoro 5x) sadržaj proteina u filtratu čvrste hranljive podloge na bazi izluženih repinih rezanaca. Takođe, za sve ispitane sirovine, tehnika kultivacije na čvrstim hranljivim podlogama se pokazala bolja u odnosu na submerznu kultivaciju.



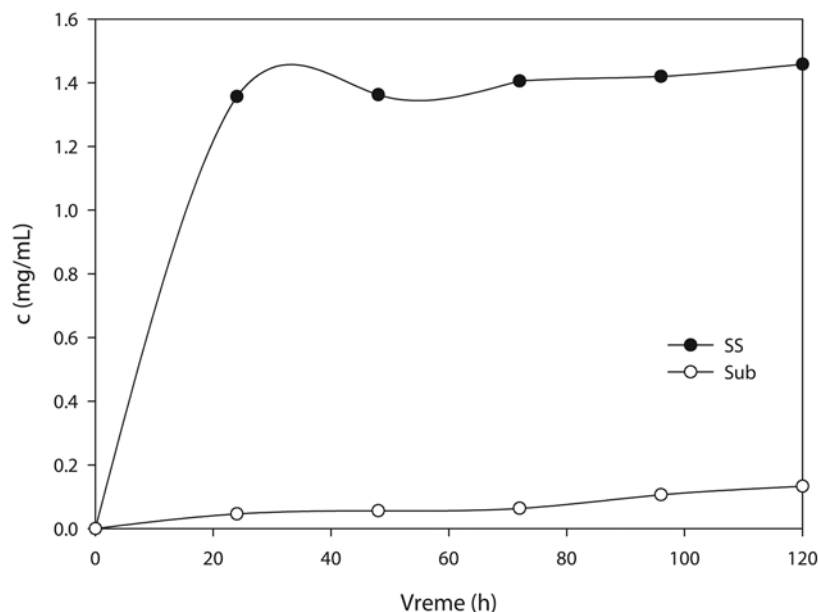
Slika 5.16. Ukupan sadržaj proteina u filtratima nakon kultivacije plesni na različitim supstratima

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da su za proizvodnju celulolitičkih enzima najpogodnija sirovina izluženi repini rezanci. Stoga je u daljem radu ispitana tok kultivacije upravo za ovu sirovinu, kako bi se bolje razumeo sam proces.

5.3.2. Ispitivanje toka kultivacije plesni na izluženim repinim rezancima

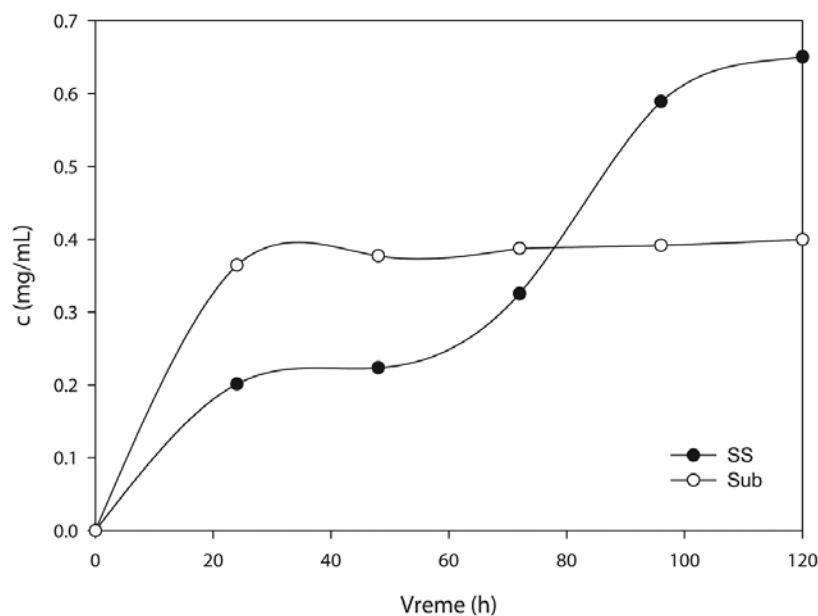
U ovom delu rada ispitana je tok kultivacije plesni *Trichoderma reesei* na čvrstoj i u tečnoj hranljivoj podlozi na bazi izluženih repinih rezanaca. S obzirom da se *solid state* bioreaktor sastojao od šest pregrađenih komora, na raspolaganju je bilo izvršiti šest uzorkovanja. Odabrani su: 0 h, odnosno momenat nakon inokulacije i 24, 48, 72, 96 i 120 h nakon inokulacije. U uzorcima (filtratima hranljivih podloga) analizirani su, kao i u prethodnom delu: sadržaj redukujućih materija, ukupan sadržaj proteina i aktivnosti amilaza, celulaza i ksilanaza.

Na slici 5.17 prikazani su rezultati sadržaja redukujućih materija u uzorcima filtrata uzetih nakon definisanih vremenskih intervala u toku kultivacije. Može se zaključiti da je sadržaj redukujućih materija značajno veći kod tehnike kultivacije na čvrstoj hranljivoj podlozi u odnosu na rezultate za submerznu kultivaciju, odnosno da je za rezultate analize aktivnosti svih ispitivanih enzima neophodno uzeti u obzir koncentraciju redukujućih materija već prisutnih u filtratima uzoraka. Koncentracija redukujućih materija u filtratima tokom kultivacije ima konstantnu vrednost za obe tehnike kultivacije.



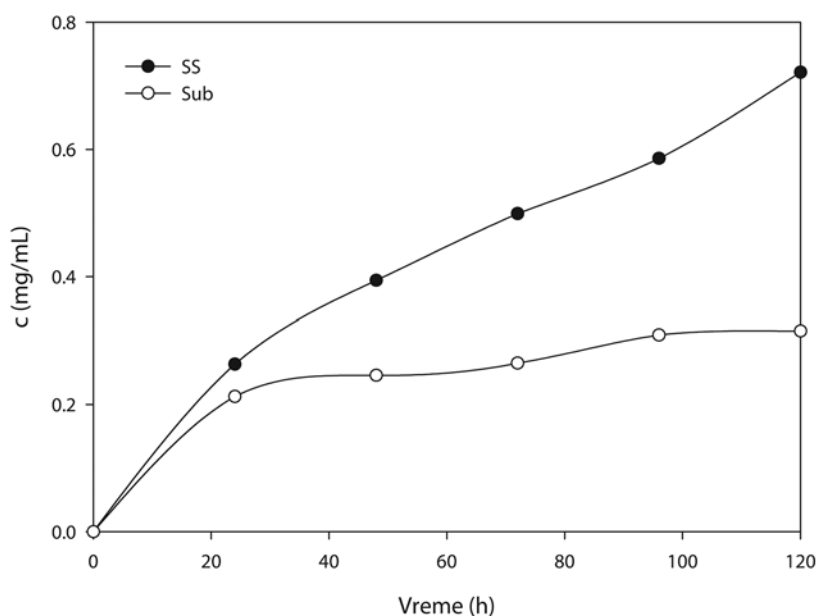
Slika 5.17. Sadržaj redukjućih materija u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih reznaca

Analizom rezultata za aktivnost amilaza tokom kultivacije plesni, prikazani na slici 5.18, uočeno je da u submerznim uslovima aktivnost ovih enzima ostaje konstantna tokom čitavog procesa kultivacije, dok je za *solid state* tehniku uočen konstantan porast aktivnosti. Na samom kraju procesa aktivnost amilaza je veća u filtratu dobijenom iz čvrste hranljive podloge na bazi izluženih repinih reznaca u odnosu na submerznu kulturu.



Slika 5.18. Aktivnost amilaza u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih reznaca

Na slici 5.19 prikazani su rezultati merenja aktivnosti celulaza u filtratima dobijenim nakon kultivacije plesni na izluženim repinim rezancima u submerznim uslovima i na čvrstim hranljivim podlogama. Kako je konstatovano i u ranijim eksperimentima, sadržaj redukujućih šećera nakon tretmana standardnih rastvora celuloze filtratima hranljivih podloga nakon kultivacije je veći u slučaju tehnike na čvrstim hranljivim podlogama. Porast celulolitičke aktivnosti je konstantan za obe tehnike kultivacije, ali je znatno intenzivniji za *solid state* uslove proizvodnje enzima.

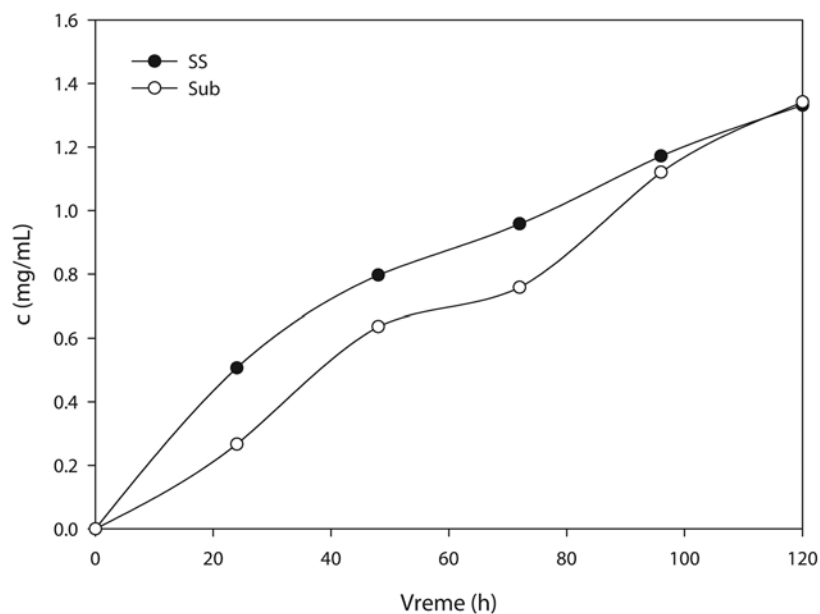


Slika 5.19. Aktivnost celulaza u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca

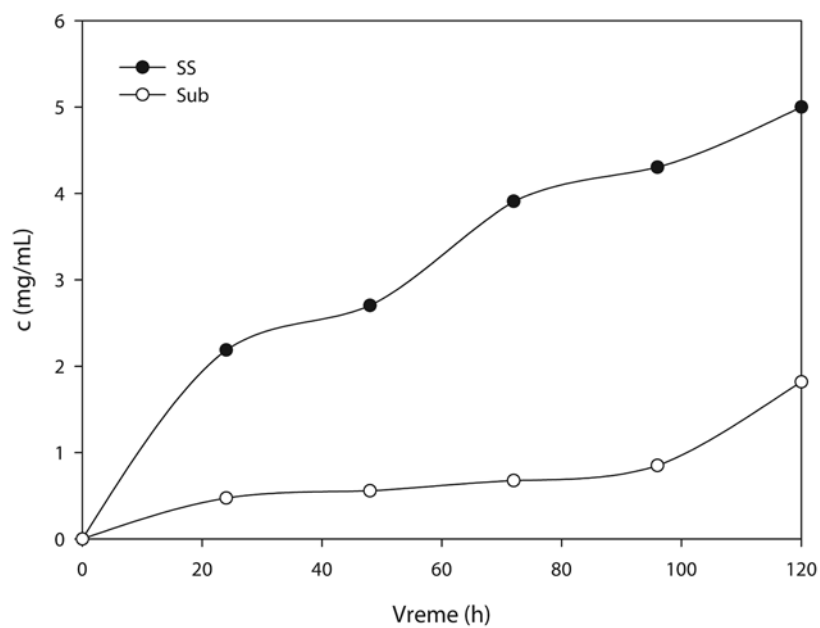
Rezultati određenih aktivnost ksilanaza u filtratima uzoraka uzetih tokom kultivacije plesni na izluženim repinim rezancima za obe ispitane tehnike prikazani su na slici 5.20. Može se uočiti da su aktivnosti u uzorcima na kraju kultivacije približno iste i da je aktivnost ksilanaza veća u odnosu na aktivnost celulaza i amilaza, kao što je bio slučaj i u eksperimentima skrininga hranljivih podloga za proizvodnju enzima. Za obe tehnike kultivacije, porast enzimske aktivnosti na standardan rastvor ksilana u toku procesa prati približno sličan trend.

Ukupan sadržaj proteina u filtratima uzoraka tokom kultivacije plesni na izluženim repinim rezancima prikazan je na slici 5.21. Uočen je drastično veći sadržaj proteina na kraju kultivacije, kao i u prethodnim eksperimentima. Za kultivaciju na čvrstoj hranljivoj podlozi ukupan sadržaj proteina konstantno raste i dostiže maksimalnu vrednost na kraju procesa. Što se tiče submerznog postupka sadržaj proteina je poprilično konstantan tokom čitavog procesa sa blagim porastom od 96 do 120 h kultivacije.

Na osnovu rezultata ispitivanja toka kultivacije plesni *Trichoderma reesei* na hranljivoj podlozi na bazi izluženih repinih rezanaca u submerznim i *solid state* uslovima, može se zaključiti da je poželjna tehnika za proizvodnju celulolitičkih enzima kultivacija na čvrstim hranljivim podlogama.



Slika 5.20. Aktivnost ksilanaza u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca



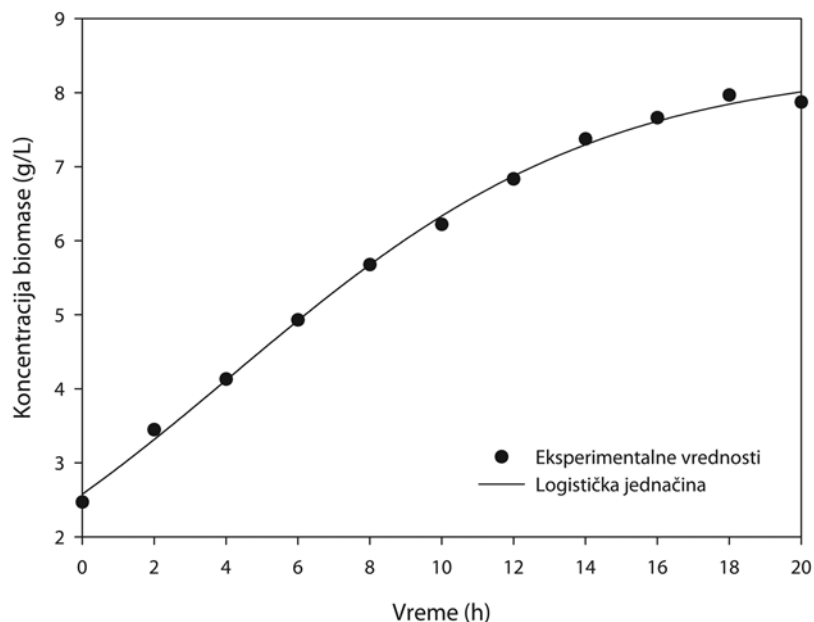
Slika 5.21. Ukupan sadržaj proteina u filtratima tokom kultivacije plesni na hranljivim podlogama na bazi izluženih repinih rezanaca

5.4. Kinetika fermentacije među- i nusproizvoda prerade šećerne repe

U ovom delu rada ispitana je kinetika diskontinualne fermentacije među- i nusproizvoda prerade šećerne repe pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* do etanola. Definisanjem kinetike i kinetičkih parametara ima za cilj prevođenje ovog bioprocesa u industrijske razmere modelovanjem procesa u narednom poglavlju. Fermentacije ekstrakcionog, retkog i gustog soka, kao i melase pri definisanim optimalnim uslovima (Grahovac, 2011) su izvedene u laboratorijskom bioreaktoru radne zapremine 10 L. Ispitana je kinetika umnožavanja biomase, potrošnje supstrata i nastanka etanola. Tokom fermentacije, analiza fermentacionog medijuma je vršena na svaka 2 h, računato od momenta inokulacije.

5.4.1. Kinetika fermentacije ekstrakcionog soka

Za definisanje kinetike i kinetičkih parametara fermentacije ekstrakcionog soka izveden je eksperiment pri definisanim optimalnim uslovima (Grahovac, 2011) u tri ponavljanja. Tipična kinetika rasta biomase je prikazana na slici 5.22. Ona predstavlja vezu između koncentracije biomase i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i krivu dobijenu na osnovu predloženog kinetičkog modela (jednačina 3).



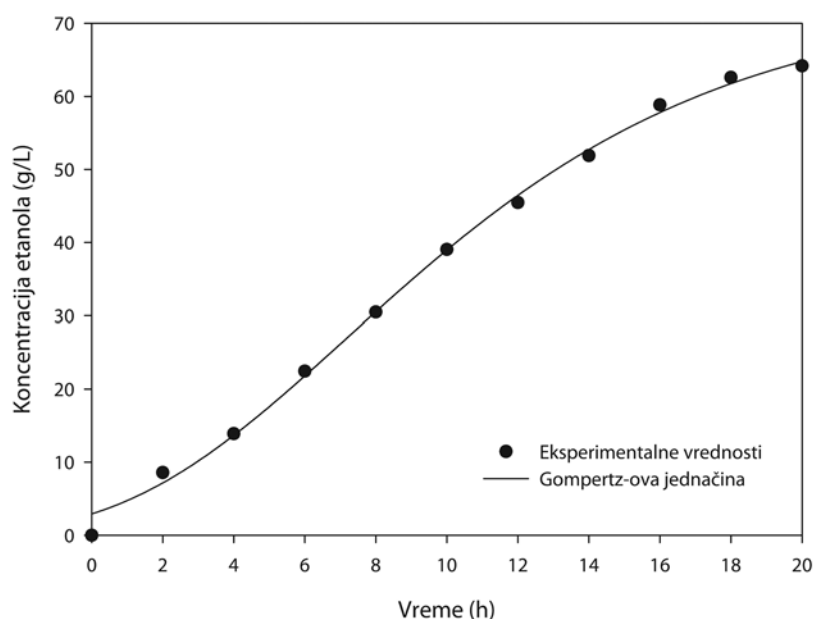
Slika 5.22. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije ekstrakcionog soka

Dobijena kriva modela ima konstantu uzlaznu putanju jer je koncentracija biomase rasla eksponencijalno tokom čitavog procesa fermentacije. Kinetički parametri su izračunati ubacivanjem vrednosti eksperimentalnih podataka u logističku jednačinu (jednačinu 3), pri čemu je dobijena jednačina 6.

$$X = \frac{2,576 \cdot \exp(0,194 \cdot t)}{1 - \frac{2,576}{8,831} \cdot (1 - \exp(0,194 \cdot t))} \quad (6)$$

Prema podešenom modelu za rast, izračunata vrednost početne koncentracije biomase ($X_0 = 2,576 \pm 0,072$ g/L) se sasvim dobro slaže sa eksperimentalnom ($X_0 = 2,469$ g/L). Isto tako, izračunate vrednosti maksimalne specifične brzine rasta ($\mu_m = 0,194 \pm 0,009$ h⁻¹) i maksimalne koncentracije biomase ($X_m = 8,381 \pm 0,123$ g/L) se poklapaju sa eksperimentalno određenim vrednostima ($\mu_m = 0,0169$ h⁻¹ i $X_m = 7,909$ g/L). Za predloženi kinetički model vrednost R^2 , kao mera ispravnosti, dobijena primenom softvera SigmaPlot®11, iznosi 0,997. Ispitivanjem eksperimentalnih i statističkih podataka dobijenih diskontinualnom fermentacijom pokazalo se da logistička jednačina predstavlja odgovarajući kinetički model za kvalitetan opis rasta ćelija kvasca u ovom specifičnom sistemu.

Eksperimentalni podaci koncentracije etanola tokom fermentacije ekstrakcionog soka kao i kinetika proizvodnje etanola prikazani su na slici 5.23. Na ovoj slici predstavljena je veza između koncentracije etanola i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i nacrtanu krivu na osnovu modifikovane *Gompertz*-ove jednačine (jednačina 4).



Slika 5.23. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije ekstrakcionog soka

Na slici 5.23 je uočeno da se koncentracija etanola blago povećava u prvih 4 h fermentacije, kada se biomasa u fazi intenzivnog umnožavanja. Čak je uočena i lag faza u proizvodnji etanola u prvom satu fermentacije. Ovo kašnjenje u produkciji etanola se javilo usled nepotpunih anaerobnih uslova na početku fermentacije, odnosno dok proizvodni mikroorganizam svojim metabolizmom nije utrošio sav kiseonik i obezbedio anaerobnu sredinu. Takođe se moglo uočiti naglo povećanje količine etanola u periodu od 4 do 20 h, kada je proizvodni mikroorganizam polako usporavao rast i prelazio u stacionarnu fazu rasta.

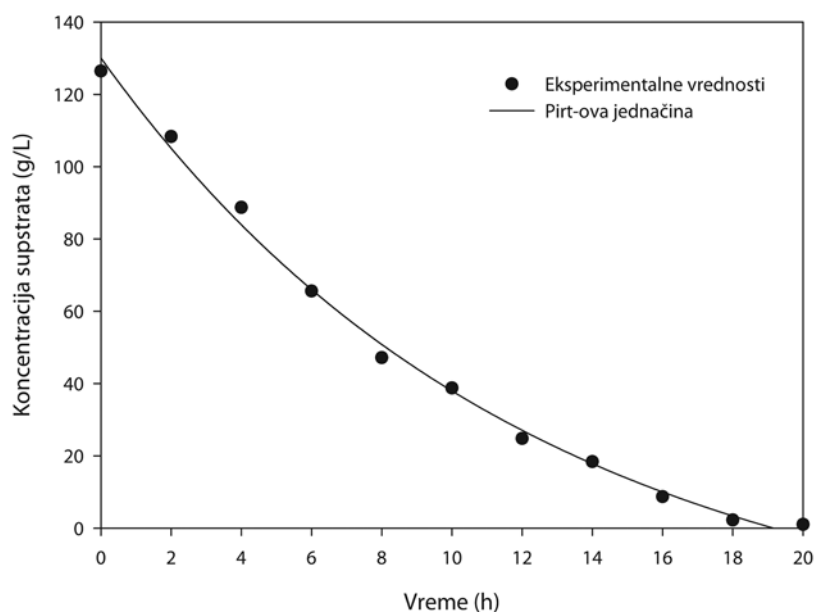
$$P = 73,31 \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{4,392 \cdot \exp(1)}{73,31} \right] \cdot (1,04 - t) + 1 \right\} \quad (7)$$

Vrednosti dobijenih parametara za proizvodnju etanola, pomoću SigmaPlot®11, prikazane su i upoređene sa eksperimentalnim podacima u tabeli 5.5. Može se uočiti da se ovi parametri veoma dobro slažu sa eksperimentalnim podacima. Korelacioni koeficijent nelinearne analize pomoću jednačine 4 iznosi 0,997, što govori o sposobnosti *Gompertz*-ovog modela da na adekvatan način opiše proizvodnju etanola tokom fermentacije ekstrakcionog soka. U poređenju sa krajnjom dobijenom koncentracijom etanola od 87 g/L iz 200 g/L šećera iz soka šećerne trske (Limtong i sar., 2007) ili 56,18 g/L etanola iz 130 g/L šećera razblažene melase šećerne repe (Razmovski i Vučurović, 2011), vrednost koncentracije etanola od 66,31 g/L iz 136,43 g/L fermentabilnih šećera u ovom radu je sasvim zadovoljavajući.

Tabela 5.5. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara nastanka etanola tokom fermentacije ekstrakcionog soka

Parametar	Izračunata vrednost	Standardna devijacija	Eksperimentalna vrednost
$r_{p,m}$ (g/L·h)	4,39	0,181	4,51
t_L (h)	1,04	0,288	~1
P_m (g/L)	73,31	2,578	66,31

Slika 5.24 prikazuje kinetiku potrošnje supstrata (redukujućih šećera) tokom fermentacije ekstrakcionog soka, uključujući i eksperimentalne podatke i krivu nacrtanu na osnovu *Pirt*-ove jednačine (jednačine 5).



Slika 5.24. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije ekstrakcionog soka

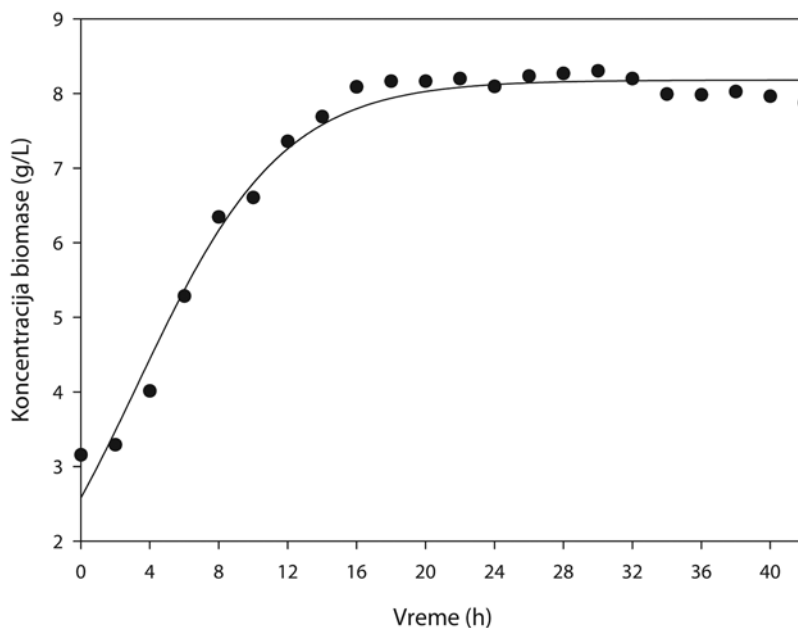
$$S = S_0 - \frac{1}{0,037} \cdot (X - X_0) - \frac{0,0538 \cdot X_m}{\mu_m} \cdot \ln \left(\frac{X_m - X_0}{X_m - X} \right) \quad (8)$$

Na slici 5.24 se može uočiti konstantno opadanje koncentracije supstrata tokom fermentacije ekstrakcionog soka. Na kraju fermentacije (20 h) koncentracija supstrata je iznosila oko 0,1 %. Dobijeni kinetički model (jednačina 8) primenom *Pirt*-ove jednačine pruža podatke o prinosu biomase ($Y_{X/S}$) i koeficijentu održavanja (m). Uočeno je odlično slaganje eksperimentalno određenih podataka i modelom predviđenih za ova dva kinetička parametra. Za predloženi kinetički model za opis potrošnje supstrata vrednost R^2 iznosi 0,997. Ovo govori u prilog činjenici da ispitani model može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis potrošnje supstrata tokom fermentacije ekstrakcionog soka.

Validacija sva tri modela je izvršena poređenjem eksperimentalno određenih vrednosti još jedne dodatne šarže sa modelom predviđenim podacima. Ove korelacije su prikazane u Prilogu (slika 8.1). Na osnovu statističkog indikatora (R^2), koji iznosi 0,997 za sva tri slučaja, još jednom je potvrđeno da se ovim modelima može opisati tok fermentacije ekstrakcionog soka pod definisanim uslovima.

5.4.2. Kinetika fermentacije retkog soka

Kinetika fermentacije retkog soka ispitana je pod optimalnim uslovima definisanim u ranijim istraživanjima (Grahovac, 2011) u tri ponavljanja. Kriva rasta biomase tokom procesa fermentacije retkog soka prikazana je na slici 5.25. Uočeno je intenzivno umnožavanje biomase u prvih 16 h fermentacije, nakon čega je proizvodni mikroorganizam ušao i do kraja procesa ostao u stacionarnoj fazi rasta.



Slika 5.25. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije retkog soka

Ubacivanjem eksperimentalnih podataka za koncentraciju biomase tokom fermentacije retkog soka u logističku jednačinu (jednačinu 3), dobijeni su podaci odgovarajućih kinetičkih parametara koji su prikazani tabeli 5.6, kao i kinetički model prikazan sledećom jednačinom:

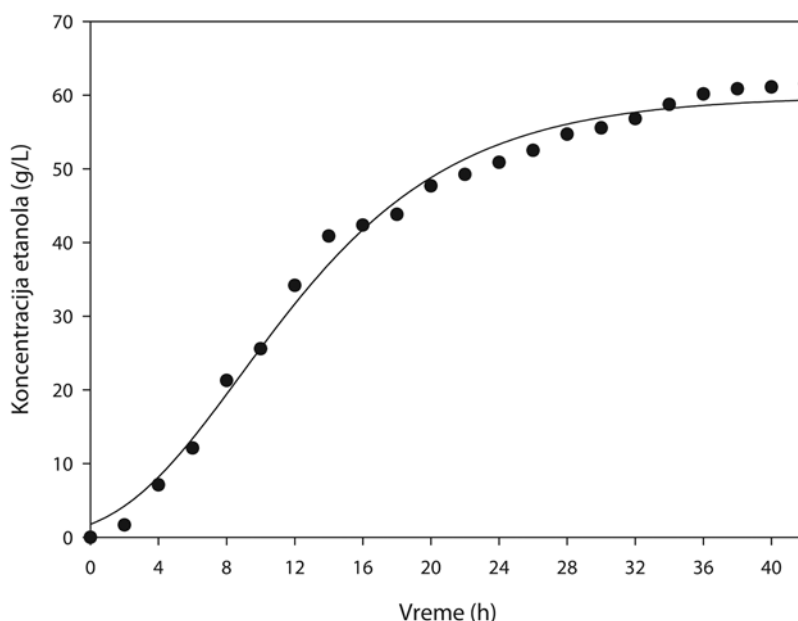
$$X = \frac{2,581 \cdot \exp(0,236 \cdot t)}{1 - \frac{2,581}{8,179} \cdot (1 - \exp(0,236 \cdot t))} \quad (9)$$

Na osnovu upoređenih eksperimentalnih vrednosti i modelom predviđenih kinetičkih parametara za rast ćelija kvasca na hranljivoj podlozi na bazi retkog soka, može se zaključiti da se ovi podaci dobro slažu. Statistički indikator (R^2) za predloženi model iznosi 0,981. Stoga je zaključeno da logistička jednačina može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis rasta proizvodnog mikroorganizma tokom fermentacije retkog soka pod zadatim uslovima.

Tabela 5.6. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara rasta biomase tokom fermentacije retkog soka

Parametar	Izračunata vrednost	Standardna devijacija	Eksperimentalna vrednost
X_0 (g/L)	2,581	0,159	3,152
μ_m (h^{-1})	0,236	0,016	0,251
X_m (g/L)	8,179	0,071	8,306

Tipična kinetika nastajanja etanola je prikazana na slici 5.26. Ona predstavlja vezu između koncentracije etanola i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i krivu dobijenu na osnovu prodloženog kinetičkog modela (jednačina 4).



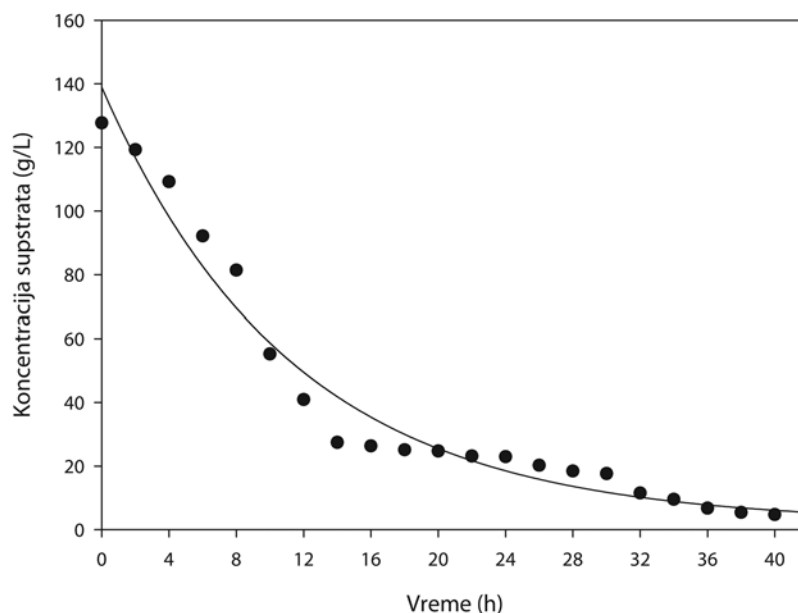
Slika 5.26. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije retkog soka

Dobijena kriva modela ima konstantnu uzlaznu putanju, ali je koncentracija etanola rasla eksponencijalno samo u prvih 16 h procesa fermentacije. Kinetički parametri su izračunati ubacivanjem vrednosti eksperimentalnih podataka u logističku jednačinu (jednačinu 4), pri čemu je dobijena jednačina 10:

$$P = 59,84 \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{3,133 \cdot \exp(1)}{59,84}\right] \cdot (1,8 - t) + 1\right\} \quad (10)$$

Prema podešenom modelu za produkciju etanola, izračunata vrednost maksimalne koncentracije etanola ($P_m = 59,84 \pm 0,939$ g/L) se sasvim dobro slaže sa eksperimentalnom ($P_m = 61,54$ g/L). Isto tako, izračunate vrednosti maksimalne brzine nastajanja etanola ($r_{p,m} = 3,133 \pm 0,169$ g/L·h) i lag faze proizvodnje etanola ($t_L = 1,8 \pm 0,51$ h) se poklapaju sa eksperimentalno određenim vrednostima ($r_{p,m} = 3,52$ g/L·h i $t_L = 2,1$ h). Za predloženi kinetički model vrednost R^2 , kao mera ispravnosti, dobijena primenom softvera SigmaPlot®11, iznosi 0,991. Ispitivanjem eksperimentalnih i statističkih podataka dobijenih diskontinualnom fermentacijom pokazalo se da modifikovana *Gompertz*-ova jednačina predstavlja odgovarajući kinetički model za kvalitetan opis proizvodnje etanola u ovom specifičnom sistemu.

Slika 5.27 prikazuje kinetiku potrošnje supstrata (redukujućih šećera) tokom fermentacije retkog soka, uključujući i eksperimentalne podatke i krivu nacrtanu na osnovu *Pirt*-ove jednačine (jednačine 5).



Slika 5.27. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije retkog soka

Na slici 5.27 se može uočiti konstantno opadanje koncentracije supstrata tokom fermentacije retkog soka. Do 16 h fermentacije potrošnje supstrata je znatno intenzivnija u odnosu na period fermentacije od 16 do 42 h. Na kraju fermentacije (42 h) koncentracija supstrata je iznosila oko 0,4 %.

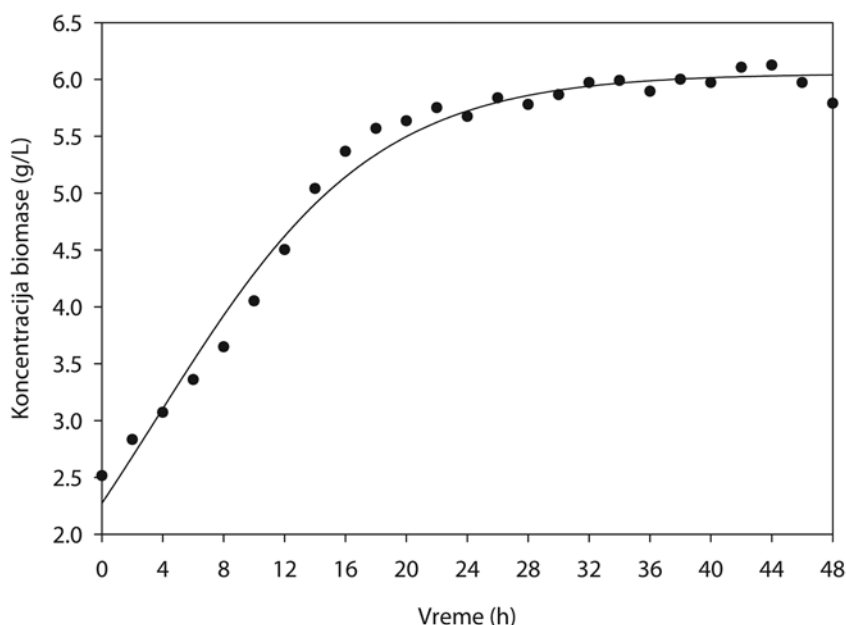
Dobijeni kinetički model (jednačina 11) primenom *Pirt*-ove jednačine pruža podatke o prinosu biomase ($Y_{x/s}$) i koeficijentu održavanja (m). Uočeno je odlično slaganje eksperimentalno određenih podataka i modelom predviđenih za ova dva kinetička parametra. Za predloženi kinetički model za opis potrošnje supstrata vrednost R^2 iznosi 0,969. Ovo govori u prilog činjenici da ispitani model može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis potrošnje supstrata tokom fermentacije retkog soka.

$$S = S_0 - \frac{1}{0,042} \cdot (X - X_0) - \frac{0,0761 \cdot X_m}{\mu_m} \cdot \ln\left(\frac{X_m - X_0}{X_m - X}\right) \quad (11)$$

Validacija sva tri modela je izvršena poređenjem eksperimentalno određenih vrednosti još jedne dodatne šarže sa modelom predviđenim podacima. Ove korelacije su prikazane u Prilogu (slika 8.2). Na osnovu statističkog indikatora (R^2), koji iznosi preko 0,96 za sva tri slučaja, još jednom je potvrđeno da se ovim modelima može opisati tok fermentacije retkog soka pod definisanim uslovima.

5.4.3. Kinetika fermentacije gustog soka

Za definisanje kinetike i kinetičkih parametara fermentacije gustog soka izveden je eksperiment pri definisanim optimalnim uslovima (Grahovac, 2011) u tri ponavljanja. Tipična kinetika rasta biomase je prikazana na slici 5.28. Ona predstavlja vezu između koncentracije biomase i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i krivu dobijenu na osnovu predloženog kinetičkog modela (jednačina 3).



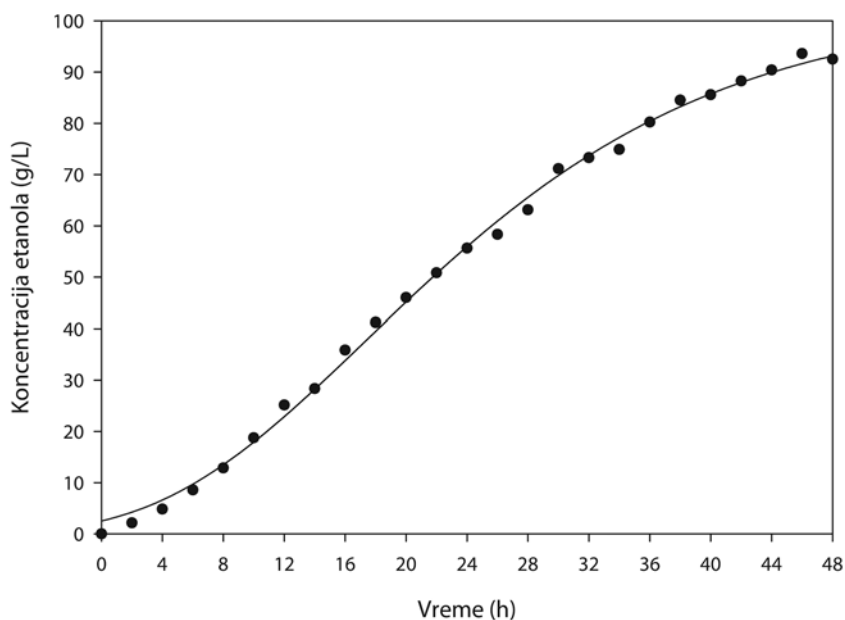
Slika 5.28. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije gustog soka

Kriva u početku ima veliki nagib jer je koncentracija biomase rasla eksponencijalno. Oko 20 h dostignuta je stacionarna faza. Kinetički parametri su izračunati ubacivanjem vrednosti eksperimentalnih podataka u logističku jednačinu (jednačinu 3), pri čemu je dobijena jednačina 12.

$$X = \frac{2,273 \cdot \exp(0,0531 \cdot t)}{1 - \frac{2,273}{6,052} \cdot (1 - \exp(0,0531 \cdot t))} \quad (12)$$

Prema podešenom modelu za rast, izračunata vrednost početne koncentracije biomase ($X_0 = 2,2733 \pm 0,0925$ g/l) se sasvim dobro slaže sa eksperimentalnom ($X_0 = 2,5154$ g/l). Isto tako, izračunate vrednosti maksimalne specifične brzine rasta ($\mu_m = 0,0531 \pm 0,0085$ h⁻¹) i maksimalne koncentracije biomase ($X_m = 6,0523 \pm 0,0542$ g/l) se poklapaju sa eksperimentalno određenim vrednostima ($\mu_m = 0,0549$ h⁻¹ i $X_m = 6,1$ g/l). Za predloženi kinetički model vrednost R^2 , kao mera ispravnosti, dobijena primenom softvera SigmaPlot® 11, iznosi 0,984. Ispitivanjem eksperimentalnih i statističkih podataka dobijenih diskontinualnom fermentacijom pokazalo se da logistička jednačina predstavlja odgovarajući kinetički model za kvalitetan opis rasta ćelija kvasca u ovom specifičnom sistemu.

Eksperimentalni podaci koncentracije etanola tokom fermentacije gustog soka kao i kinetika proizvodnje etanola prikazani su na slici 5.29. Na ovoj slici predstavljena je veza između koncentracije etanola i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i nacrtanu krivu na osnovu modifikovane *Gompertz*-ove jednačine (jednačina 4).



Slika 5.29. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije gustog soka

$$P = 102,98 \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{2,85 \cdot \exp(1)}{102,98} \right] \cdot (4,13 - t) + 1 \right\} \quad (13)$$

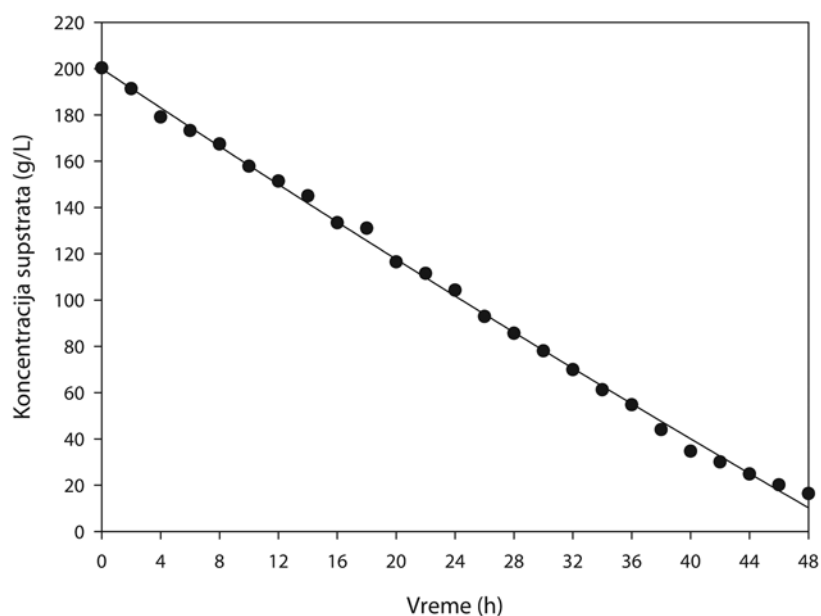
Na slici 5.29 se vidi da se koncentracija etanola blago povećava u prvih 12 h fermentacionog procesa, kada je biomasa u fazi intenzivnog umnožavanja. Takođe se može uočiti naglo povećanje količine etanola u periodu od 12 do 48 h, kada proizvodni mikroorganizam polako usporava svoj rast i prelazi u stacionarnu fazu rasta.

Vrednosti dobijenih parametara proizvodnje etanola, pomoću SigmaPlot®11, su prikazane i upoređene sa eksperimentalnim podacima u tabeli 5.7. Primećuje se da se ovi parametri dobro poklapaju. Korelacioni koeficijent nelinearne analize pomoću jednačine (4) iznosi 0,997, što govori o sposobnosti modifikovanog *Gompertz*-ovog modela da na adekvatan način opiše tok proizvodnje etanola tokom ovog procesa fermentacije.

Tabela 5.7. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara nastanka etanola tokom fermentacije gustog soka

Parametar	Izračunata vrednost	Standardna devijacija	Eksperimentalna vrednost
$r_{p,m}$ (g/L·h)	2,85	0,0652	2,54
t_L (h)	4,13	0,3501	~4
P_m (g/L)	102,98	1,8349	99,09

Slika 5.30 prikazuje kinetiku potrošnje supstrata (redukujućih šećera) tokom fermentacije gustog soka, uključujući i eksperimentalne podatke i krivu nacrtanu na osnovu *Pirt*-ove jednačine (jednačine 5).



Slika 5.30. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije gustog soka

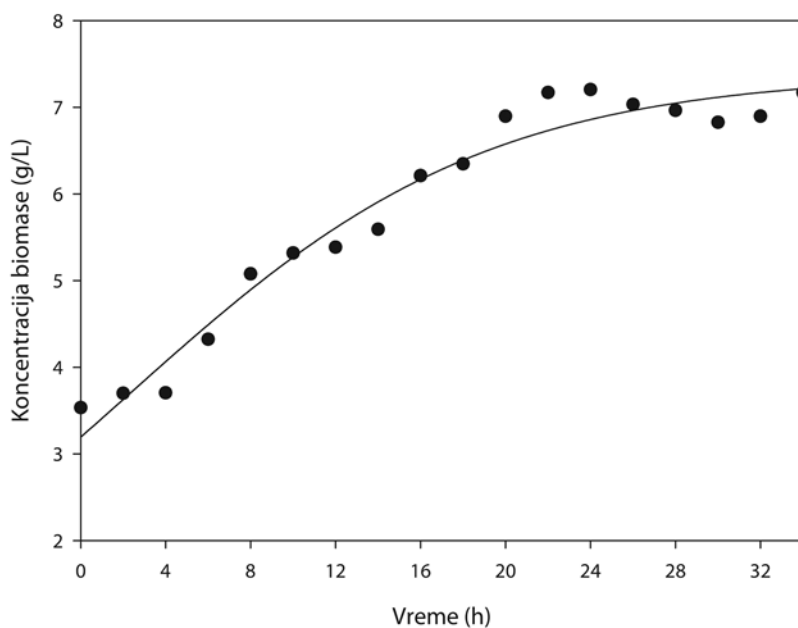
$$S = S_0 - \frac{1}{0,02} \cdot (X - X_0) - \frac{0,0286 \cdot X_m}{\mu_m} \cdot \ln\left(\frac{X_m - X_0}{X_m - X}\right) \quad (14)$$

Na slici 5.30 se može uočiti konstantno linearno opadanje koncentracije supstrata tokom fermentacije gustog soka. Na kraju fermentacije (48 h) koncentracija supstrata je iznosila oko 1,6 %. Dobijeni kinetički model (jednačina 14) primenom *Pirt*-ove jednačine pruža podatke o prinosu biomase ($Y_{X/S}$) i koeficijentu održavanja (m). Uočeno je odlično slaganje eksperimentalno određenih podataka i modelom predviđenih za ova dva kinetička parametra. Za predloženi kinetički model za opis potrošnje supstrata vrednost R^2 iznosi 0,997. Ovo govori u prilog činjenici da ispitani model može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis potrošnje supstrata tokom fermentacije gustog soka.

Validacija sva tri modela je izvršena poređenjem eksperimentalno određenih vrednosti još jedne dodatne šarže sa modelom predviđenim podacima. Ove korelacije su prikazane u Prilogu (slika 8.3). Na osnovu statističkog indikatora (R^2), koji iznosi preko 0,98 za sva tri slučaja, još jednom je potvrđeno da se ovim modelima može opisati tok fermentacije gustog soka pod definisanim uslovima.

5.4.4. Kinetika fermentacije melase

Za definisanje kinetike i kinetičkih parametara fermentacije melase izveden je eksperiment pri definisanim optimalnim uslovima (Grahovac, 2011) u tri ponavljanja. Tipična kinetika rasta biomase je prikazana na slici 5.31. Ona predstavlja vezu između koncentracije biomase i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i krivu dobijenu na osnovu predloženog kinetičkog modela (jednačina 3). Uočeno je intenzivno umnožavanje biomase u prvih 24 h fermentacije, nakon čega je proizvodni mikroorganizam ušao i do kraja procesa ostao u stacionarnoj fazi rasta.



Slika 5.31. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije melase

Ubacivanjem eksperimentalnih podataka za koncentraciju biomase tokom fermentacije melase u logističku jednačinu (jednačinu 3), dobijeni su podaci odgovarajućih kinetičkih parametara koji su prikazani tabeli 5.8, kao i kinetički model prikazan sledećom jednačinom:

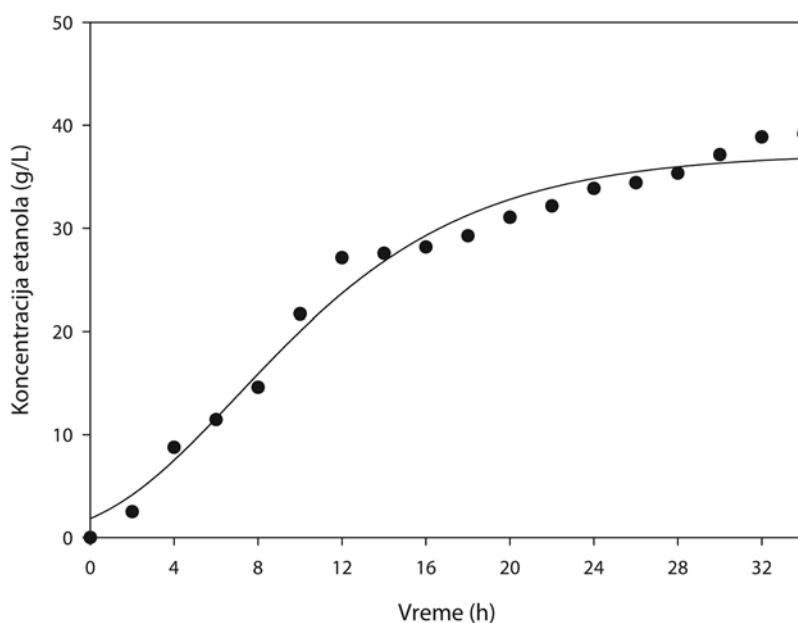
$$X = \frac{3,194 \cdot \exp(0,118 \cdot t)}{1 - \frac{3,194}{7,382} \cdot (1 - \exp(0,118 \cdot t))} \quad (15)$$

Na osnovu upoređenih eksperimentalnih vrednosti i modelom predviđenih kinetičkih parametara za rast ćelija kvasca na hranljivoj podlozi na bazi melase, može se zaključiti da se ovi podaci dobro slažu. Statistički indikator (R^2) za predloženi model iznosi 0,964. Stoga je zaključeno da logistička jednačina može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis rasta proizvodnog mikroorganizma tokom fermentacije melase pod zadatim uslovima.

Tabela 5.8. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara rasta biomase tokom fermentacije melase

Parametar	Izračunata vrednost	Standardna devijacija	Eksperimentalna vrednost
X_0 (g/L)	3,194	0,171	3,532
μ_m (h^{-1})	0,118	0,015	0,201
X_m (g/L)	7,382	0,201	7,203

Tipična kinetika nastajanja etanola je prikazana na slici 5.32. Ona predstavlja vezu između koncentracije etanola i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i krivu dobijenu na osnovu prodloženog kinetičkog modela (jednačina 4).



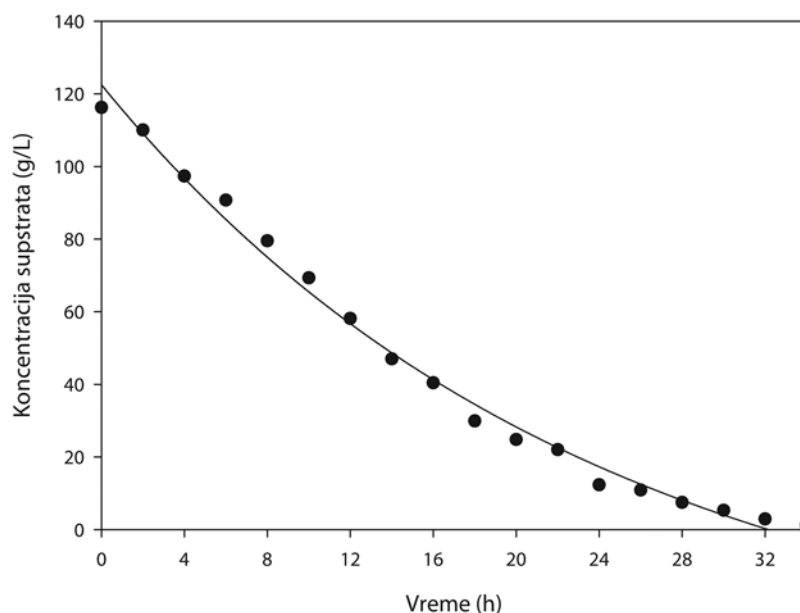
Slika 5.32. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije melase

Dobijena kriva modela ima konstantnu uzlaznu putanju, ali je koncentracija etanola rasla eksponencijalno samo u prvih 12 h procesa fermentacije. Kinetički parametri su izračunati ubacivanjem vrednosti eksperimentalnih podataka u logističku jednačinu (jednačinu 4), pri čemu je dobijena jednačina 16:

$$P = 37,29 \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{2,16 \cdot \exp(1)}{37,29} \right] \cdot (0,64 - t) + 1 \right\} \quad (16)$$

Prema podešenom modelu za produkciju etanola, izračunata vrednost maksimalne koncentracije etanola ($P_m = 37,29 \pm 1,0309$ g/L) se sasvim dobro slaže sa eksperimentalnom ($P_m = 39,15$ g/L). Isto tako, izračunate vrednosti maksimalne brzine nastajanja etanola ($r_{p,m} = 2,162 \pm 0,185$ g/L·h) i lag faze proizvodnje etanola ($t_L = 0,64 \pm 0,72$ h) se poklapaju sa eksperimentalno određenim vrednostima ($r_{p,m} = 2,42$ g/L·h i $t_L = 0,5$ h). Za predloženi kinetički model vrednost R^2 , kao mera ispravnosti, dobijena primenom softvera SigmaPlot®11, iznosi 0,981. Ispitivanjem eksperimentalnih i statističkih podataka dobijenih diskontinualnom fermentacijom pokazalo se da modifikovana *Gompertz*-ova jednačina predstavlja odgovarajući kinetički model za kvalitetan opis proizvodnje etanola u ovom specifičnom sistemu.

Slika 5.33 prikazuje kinetiku potrošnje supstrata (redukujućih šećera) tokom fermentacije melase, uključujući i eksperimentalne podatke i krivu nacrtanu na osnovu *Pirt*-ove jednačine (jednačine 5).



Slika 5.33. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije melase

Na slici 5.33 se može uočiti konstantno opadanje koncentracije supstrata tokom fermentacije melase. Na kraju fermentacije (34 h) koncentracija supstrata je iznosila oko 0,1 %. Dobijeni kinetički model (jednačina 16) primenom *Pirt*-ove jednačine pruža podatke o prinosu biomase ($Y_{X/S}$) i koeficijentu održavanja (m). Uočeno je odlično slaganje eksperimentalno određenih podataka i modelom predviđenih za ova dva kinetička parametra.

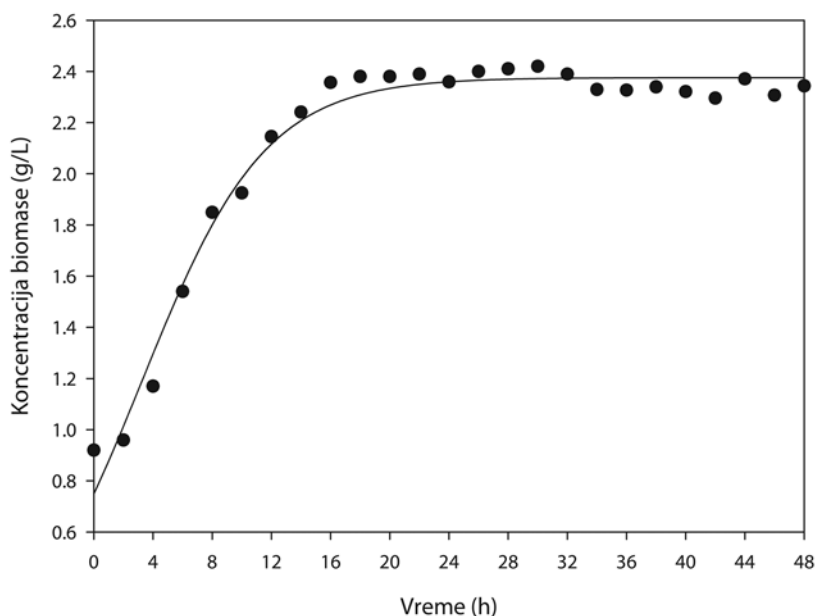
Za predloženi kinetički model za opis potrošnje supstrata vrednost R^2 iznosi 0,992. Ovo govori u prilog činjenici da ispitani model može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis potrošnje supstrata tokom fermentacije melase.

$$S = S_0 - \frac{1}{0,032} \cdot (X - X_0) - \frac{0,0614 \cdot X_m}{\mu_m} \cdot \ln\left(\frac{X_m - X_0}{X_m - X}\right) \quad (17)$$

Validacija sva tri modela je izvršena poređenjem eksperimentalno određenih vrednosti još jedne dodatne šarže sa modelom predviđenim podacima. Ove korelacije su prikazane u Prilogu (slika 8.4). Na osnovu statističkog indikatora (R^2), koji iznosi preko 0,96 za sva tri slučaja, još jednom je potvrđeno da se ovim modelima može opisati tok fermentacije melase pod definisanim uslovima.

5.4.5. Kinetika fermentacije izluženih repinih rezanaca

Za definisanje kinetike i kinetičkih parametara fermentacije izluženih repinih rezanaca izveden je eksperiment pri početnoj koncentraciji redukujućih šećera od 153 g/L (od kojih je 93 g/L glukoza i 53 g/L ksiloza) u tri ponavljanja. Tipična kinetika rasta biomase je prikazana na slici 5.34. Ona predstavlja vezu između koncentracije biomase i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i krivu dobijenu na osnovu predloženog kinetičkog modela (jednačina 3).



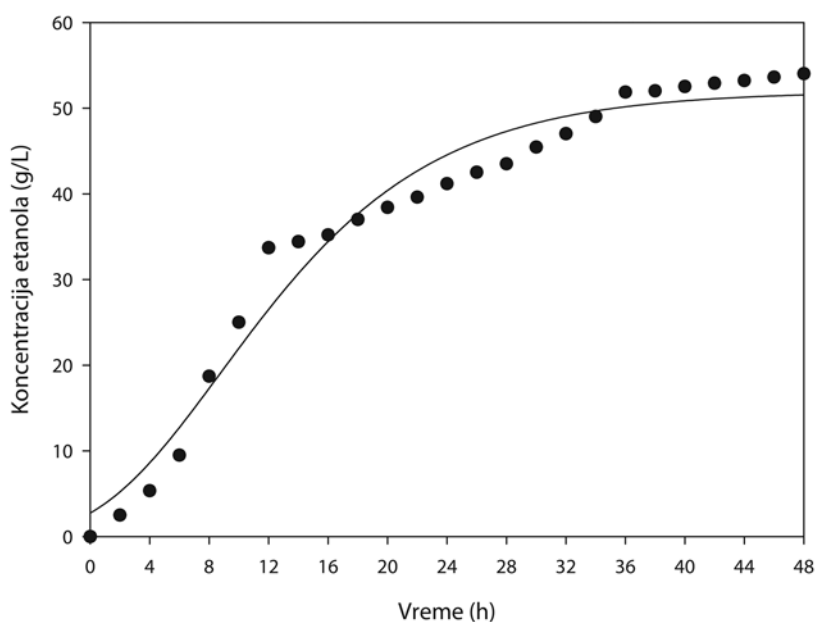
Slika 5.34. Kinetika rasta biomase tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca

Kriva u početku ima veliki nagib jer je koncentracija biomase rasla eksponencijalno. Oko 16 h dostignuta je stacionarna faza. Kinetički parametri su izračunati ubacivanjem vrednosti eksperimentalnih podataka u logističku jednačinu (jednačinu 3), pri čemu je dobijena jednačina 18.

$$X = \frac{0,749 \cdot \exp(0,2393 \cdot t)}{1 - \frac{0,749}{2,376} \cdot (1 - \exp(0,2393 \cdot t))} \quad (18)$$

Prema podešenom modelu za rast, izračunata vrednost početne koncentracije biomase ($X_0 = 0,749 \pm 0,0448$ g/l) se sasvim dobro slaže sa eksperimentalnom ($X_0 = 0,92$ g/l). Isto tako, izračunate vrednosti maksimalne specifične brzine rasta ($\mu_m = 0,2393 \pm 0,0158$ h⁻¹) i maksimalne koncentracije biomase ($X_m = 2,376 \pm 0,0177$ g/l) se poklapaju sa eksperimentalno određenim vrednostima ($\mu_m = 0,218$ h⁻¹ i $X_m = 2,4$ g/l). Za predloženi kinetički model vrednost R^2 , kao mera ispravnosti, dobijena primenom softvera SigmaPlot®11, iznosi 0,981. Ispitivanjem eksperimentalnih i statističkih podataka dobijenih diskontinualnom fermentacijom pokazalo se da logistička jednačina predstavlja odgovarajući kinetički model za kvalitetan opis rasta ćelija kvasca u ovom specifičnom sistemu.

Eksperimentalni podaci koncentracije etanola tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca kao i kinetika proizvodnje etanola prikazani su na slici 5.35. Na ovoj slici predstavljena je veza između koncentracije etanola i vremena fermentacije, uključujući eksperimentalne podatke i nacrtanu krivu na osnovu modifikovane *Gompertz*-ove jednačine (jednačina 4).



Slika 5.35. Kinetika nastajanja etanola tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca

$$P = 51,96 \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{2,34 \cdot \exp(1)}{51,96} \right] \cdot (0,63 - t) + 1 \right\} \quad (19)$$

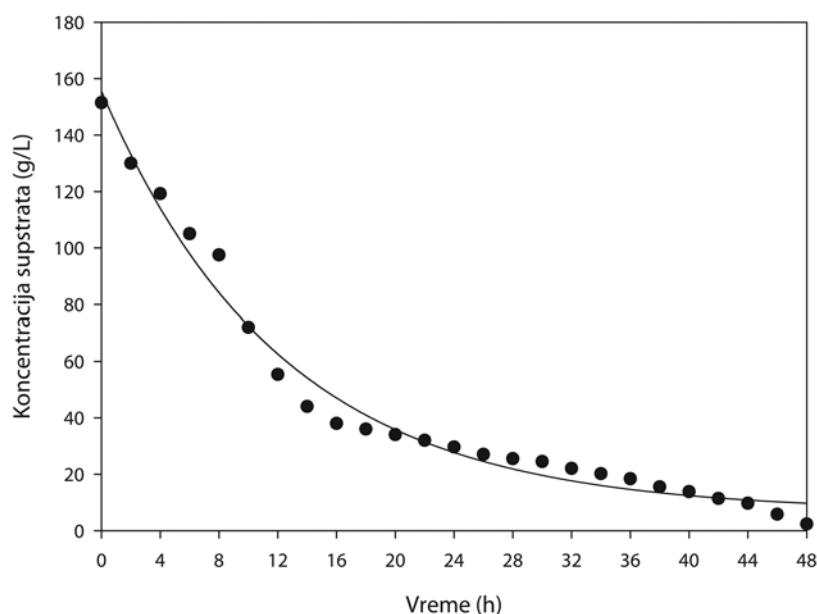
Na slici 5.35 se vidi da se koncentracija etanola naglo povećava u prvih 16 h fermentacionog procesa, kada je biomasa u fazi intenzivnog umnožavanja. Takođe se može uočiti blago povećanje količine etanola u periodu od 16 do 48 h, kada proizvodni mikroorganizam polako usporava svoj rast i prelazi u stacionarnu fazu rasta.

Vrednosti dobijenih parametara proizvodnje etanola, pomoću SigmaPlot®11, su prikazane i upoređene sa eksperimentalnim podacima u tabeli 5.9. Primećuje se da se ovi parametri dobro poklapaju. Korelacioni koeficijent nelinearne analize pomoću jednačine (4) iznosi 0,971, što govori o sposobnosti modifikovanog *Gompertz*-ovog modela da na adekvatan način opiše tok proizvodnje etanola tokom ovog procesa fermentacije.

Tabela 5.9. Modelom predviđene i eksperimentalne vrednosti parametara nastanka etanola tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca

Parametar	Izračunata vrednost	Standardna devijacija	Eksperimentalna vrednost
$r_{p,m}$ (g/L·h)	2,34	0,2068	2,57
t_L (h)	0,63	0,9756	~0
P_m (g/L)	51,96	1,2860	54,01

Slika 5.36 prikazuje kinetiku potrošnje supstrata (redukujućih šećera) tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca, uključujući i eksperimentalne podatke i krivu nacrtanu na osnovu *Pirt*-ove jednačine (jednačine 5).



Slika 5.36. Kinetika potrošnje supstrata tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca

Na slici 5.36 se prvo može uočiti intenzivno opadanje koncentracije supstrata (do 16 h fermentacije), a potom blagi pad sve do kraja procesa. Na kraju fermentacije (48 h) koncentracija supstrata je iznosila oko 0,2 %. Dobijeni kinetički model (jednačina 20) primenom *Pirt*-ove jednačine pruža podatke o prinosu biomase ($Y_{x/s}$) i koeficijentu održavanja (m). Uočeno je odlično slaganje eksperimentalno određenih podataka i modelom predviđenih za ova dva kinetička parametra. Za predloženi kinetički model za opis potrošnje supstrata vrednost R^2 iznosi 0,983. Ovo govori u prilog činjenici da ispitani model može sa zadovoljavajućim rezultatima da posluži za opis potrošnje supstrata tokom fermentacije.

$$S = S_0 - \frac{1}{0,01} \cdot (X - X_0) - \frac{0,0203 \cdot X_m}{\mu_m} \cdot \ln \left(\frac{X_m - X_0}{X_m - X} \right) \quad (20)$$

Validacija sva tri modela je izvršena poređenjem eksperimentalno određenih vrednosti još jedne dodatne šarže sa modelom predviđenim podacima. Ove korelacije su prikazane u Prilogu (slika 8.5). Na osnovu statističkog indikatora (R^2), koji iznosi preko 0,97 za sva tri slučaja, još jednom je potvrđeno da se ovim modelima može opisati tok fermentacije izluženih repinih rezanaca pod definisanim uslovima.

Na osnovu rezultata ispitivanja kinetike proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe, odnosno primenom logističke, *Gompertz*-ove i *Pirt*-ove jednačine za opis rasta biomase, nastajanja etanola i potrošnje supstrata tokom procesa fermentacije pomenutih hranljivih podloga može se izvesti konačan zaključak da predloženi kinetički modeli mogu na zadovoljavajući način da opišu ponašanje definisanih procesnih parametara tokom izvođenja bioprocesa.

5.5. Model bioprocesa proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe

Definisanjem kinetike proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe omogućena je upotreba dobijenih kinetičkih modela i parametara za simulaciju datog bioprocesa. U ovom delu biće razmotreni modeli generisani u softverskom paketu SuperPro Designer na osnovu eksperimentalnih podataka iz ovog rada, kao i dostupne literature. Ovi modeli mogu pomoći u procesu projektovanja jednog ovakvog postrojenja širenjem baze podataka, što inženjerima olakšava donošenje odluka (Krajnc i Glavič, 2009).

5.5.1. Potencijal Srbije za proizvodnju etanola

Republika Srbija ima veliki potencijal za proizvodnju energije iz obnovljivih sirovina. Proizvodnja energija iz obnovljivih sirovina u Republici Srbiji je u ranoj fazi razvoja i stoga zahteva adekvatan pristup i strateško planiranje (Dodić i sar., 2010). Zajedno sa tehnološkom modernizacijom i porastom energetske efikasnosti, upotreba obnovljivih izvora energije je jedan od prioriteta Republike Srbije, koja se kao potpisnik Kyoto Protokola obavezala da poveća udeo energije proizveden iz obnovljivih izvora sa 1 % na 20 % do 2015.

Republika Srbija ima oko 5092 miliona hektara poljoprivrednog zemljišta (0,68 hektara po stanovniku) od kojih 4218 miliona hektara je obradivo zemljište (0,56 hektara po stanovniku), što je iznad proseka i standarda u Evropskim zemljama. Oko 10 % obradivog zemljišta pripada državi i državnim kompanijama, dok 90 % je u privatnom vlasništvu (Bulletin 523, 2010).

Pogodno zemljište i klimatski uslovi omogućavaju razvoj različitog spektra poljoprivrednih kultura, odnosno kultivaciju žitarica, industrijskog bilja, voća i povrća, medicinskog bilja i dr.

Ukupna potrošnja šećera po stanovniku u Republici Srbiji iznosi oko 25-30 kg, što je na godišnjem nivou oko 240 000 tona šećera. Međutim, proizvodni kapaciteti domaćih fabrika šećera su mnogo veći od ukupne potrošnje šećera. S obzirom da je u poslednjih nekoliko godina prinos šećerne repe oko 48 t/ha, proizvodnja šećerne repe je oko 3 207 000 tona ili oko 480 000 tona proizvedenog šećera (Report SRB233 PO15, 2011). Ovo znači da pored godišnje potrošnje šećera od 240 000 tona i maksimalno dozvoljene količine za izvoz u EU od 180 000 tona, još uvek posotji višak od 60 000 tona šećera, odnosno preračunato na ekstrakcioni sok oko 520 000 tona se može upotrebiti na proizvodnju etanola.

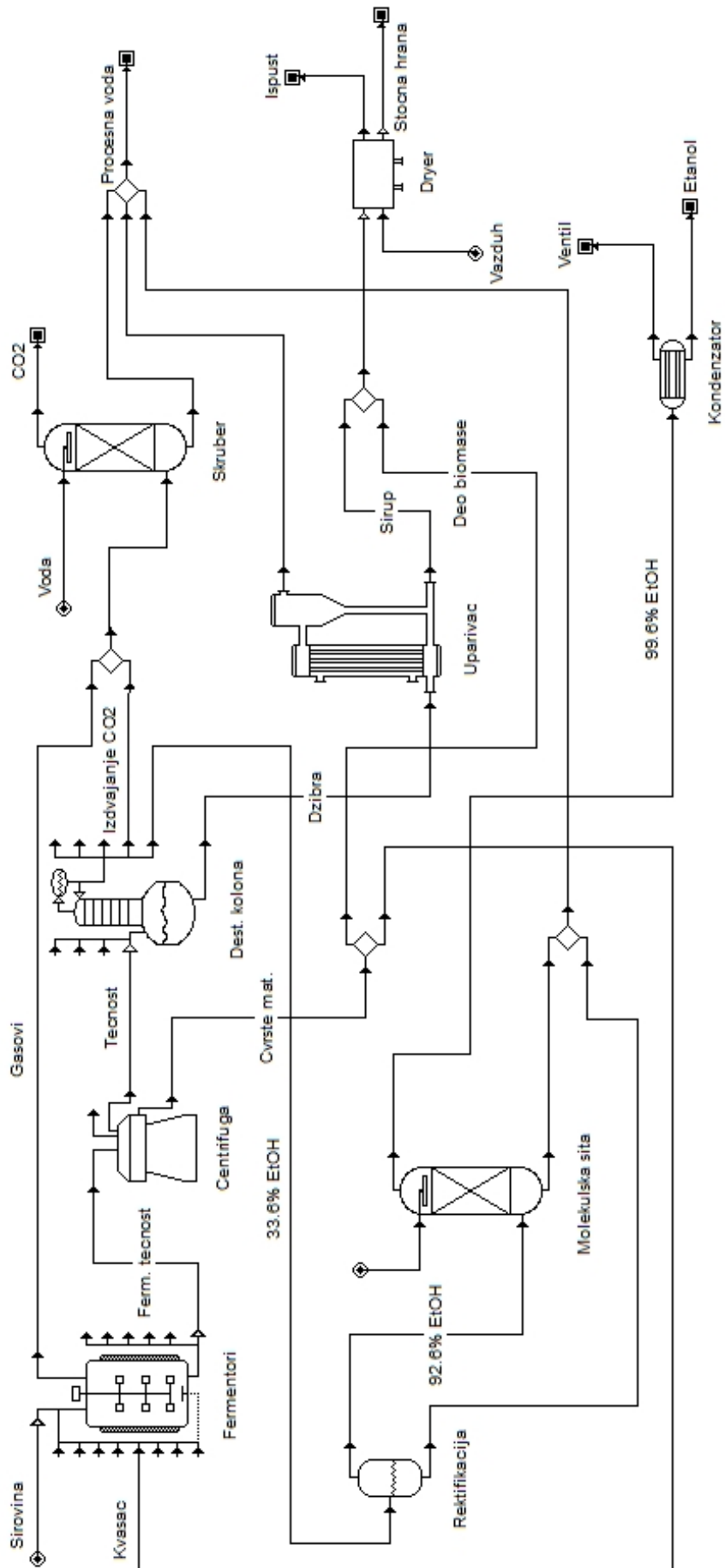
Prema statistici godišnja proizvodnja šećerne repe je oko 3 280 000 tona (Agriculture statistics of Republic of Serbia, 2011). Nakon prerade ove količine šećerne repe zaostaje oko 820 000 tona vlažnih presovanih izluženih repinih rezanaca (sadržaj vode približno 75-80 %), koji se mogu prevesti u suve izlužene repine rezance (oko 10 % sadržaj vode) (Hutnan i sar., 2000). Zbog svoje dostupnosti i niske cene, izluženi repini rezanci mogu imati veliki potencijal za proizvodnju etanola u Srbiji (Ivetic i sar., 2012).

5.5.2. Model proizvodnje etanola iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe

5.5.2.1. Opis bioprocasa

Pojednostavljeni dijagram toka proizvodnje etanola iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe (ekstrakcioni, retki i gusti sok i melasa) prikazan je na slici 5.37. U toku kampanje bilo koja od navedenih sirovina je dostupna za snabdevanje fermentora. S obzirom da žetva šećerne repe traje veoma kratko, dugoročno skladištenje je neophodno kako kako bi se obezbedio napoj postrojenju. Usled loših karakteristika skladištenja ekstrakcionog i retkog soka, koji su poznati po lakoj razgradnji usled dejstva mikroorganizama (Dodić i sar., 2009), oni se moraju koncentrovati višestepenim uparivačima (standardna oprema u fabrikama šećera) do visoke koncentracije šećera kako bi se smanjila zapremina skladištenja i inhibirao mikrobn rast. Otuda je upotreba gustog soka povoljnija u odnosu na prethodno pomenuta dva soka. Stoga, neophodno je napomenuti da je tokom ostatka godine neophodno razblažiti koncentrovani sok do optimalne koncentracije šećera pre upotrebe u bioprocasu.

Komercijalni pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* se koristi kao biokatalizator, odnosno će fermentisati šećere do etanola i drugih sporednih proizvoda. Šest sudova koji rade u kaskadi su upotrebljeni za fermentore. Nakon fermentacije, fermentaciona tečnost se šalje na centrifugiranje kako bi se uklonile ćelije biomase. Čvrsta frakcija, koja većinom sadrži ćelija kvasca, se deli na dva dela, od kojih jedan se vraća nazad u proces kao deo inokuluma za fermentaciju, dok se drugi deo šalje na dalju obradu.



Slika 5.37. Pojednostavljen dijagram toka proizvodnje etanola iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe

U ovom radu razmatrani deo biomase, koji se reciklira (vraća nazad u proces), bio je 10, 30, 50, 70 i 90 %. Sa druge strane, tečna frakcija nakon operacije centrifugiranja ide na destilaciju i adsorpciju na molekulskim sitima, kako bi se dobio i izdvojio 99,6 % etanol. Destilacija se odvija u dve kolone. Prva (destilaciona) kolona uklanja rastvoreni CO₂ i veći deo vode, dok druga (rektifikaciona) kolona koncentruje rastvor etanola do sastava blizu azeotropne smeše. Sva voda iz ove smeše se uklanja adsorpcijom u parnoj fazi na molekulskim sistima. Konačno, 99,6 % čista parna faza etanola se hladi u razmenjivaču toplote, kondenzuje i prebacuje u skladište.

Gasovi, koji nastaju tokom fermentacije (uglavnom sadrže CO₂, vodu i nešto malo etanola), kao i gasni ispust destilacione kolone se prečišćavaju u vodenom skuberu, izdvajanjem skoro čitave količine ugljendioksida. Na dnu destilacione kolone nalaze se sve neiskorišćene organske materije (izvori šećera, azota, itd.). Ova džibra se koncentruje u višestepenom uparivaču upotrebom otpadne toplote iz destilacije. Ovako koncentrovani sirup iz uparivača se meša sa delom biomase koja se ne vraća u proces fermentacije i uvodi u sušnicu tipa rotacionog bubnja, gde se suši sa ciljem proizvodnje nusproizvoda koji će se prodavati kao hrana za stoku. Sa druge strane, kondenzat isparenja iz uparivača se meša sa sadržajem dna rektifikacione kolone, tečnim izlazom molekulskih sita i skrubera i kao takav se koristi kao procesna voda, s obzirom na relativno nizak sadržaj organskih materija u ovim izlaznim tokovima. Jedna dvadesetina ove vode se vraća nazad u skuber, dok se ostatak koristi za razblaživanje sirovine, koja se koristi kao hranljiva podloga, do koncentracije šećera za proces fermentacije.

5.5.2.2. Procesni parametri

Podaci za ulazne tokove i podaci operativnih uslova ispitanog bioprocesa su uzeti delom iz ovog rada, a delom iz literature, dok su rezultati (podaci vezani za opremu i sam bioproces) dobijeni direktno iz programa SuperPro Designer.

Količina sirovine predviđena za jednu šaržu ovog modela je 300 t, što je dobijeno na osnovu godišnjeg potencijalnog viška među- i nusproizvoda tehnologija prerade šećerne repe u Srbiji (Report SRB23 PO15, 2011) uz maksimalan mogući broj šarži predviđen od strane modela. Sadržaj fermentabilnih šećera u hranljivoj podlozi se podešava na 12,5 % razblaživanjem koncentrovanog soka iz skladišta, s obzirom da se ova koncentracija pokazala kao optimalna za proizvodnju etanola iz datih sirovina (Grahovac, 2011). Sadržaj pepela i proteina u hranljivoj podlozi nakon razblaživanja iznosi 0,03 i 0,01 %, redosledom, dobijen na osnovu prosečnog sastava pomenutih sokova iz nekoliko domaćih fabrika šećera (Popov i sar., 2010).

Početna koncentracija inokuluma je podešena na oko 10 % količine biomase u odnosu na količinu hranljive podloge. Fermentacija se izvodi u šest 385 000 L (16,5 m visina i 5,5 m prečnik) bioreaktorima. Vreme trajanja fermentacije je podešeno na 20 h a temperatura fermentacije na 28 °C. Reakcije i konverzije u procesu fermentacije definisane su kinetikom koja je navedena u ovom radu. Efektivna koncentracija etanola u fermentacionoj tečnosti je 6,15 %, dok je koncentracija šećera 0,23 %.

Fermentaciona tečnost se nakon fermentacije šalje na disk centrifugu sa ciljem uklanjanja biomase (protok 157 000 L/h). Tok biomase (20 000 kg/h) se nakon toga deli i jedan deo (u osnovnom slučaju 50 %) odlazi na sušenje, dok se drugi deo vraća nazad u sekciju fermentacije. Nakon centrifugiranja tečni deo ide u destilacionu kolonu visine 13,4 m i prečnika 5,3 m, koja radi u takvom režimu da uklanja CO₂ i što je moguće manje etanola na vrhu kolone, dok na dnu kolone uklanja do čak 86 % vode (Aden i sar., 2002). Refluksni odnos iznosi 3:1. Gasovi na vrhu kolone sadrže 91,61 % CO₂, 8,13 % etanola i 0,25 % vode. Sav CO₂ i samo 3,97 % etanola se izvode iz kolone na ovom mestu. Preko 96 % etanola iz napoja se izdvaja kao 33,6 % vodena smeša u ovom koraku.

Smeša etanola i vode se izvodi kao parna faza sa središnjeg dela kolone i uvodi direktno u rektifikacionu kolonu, koja ima radnu zapreminu od 4900 L. Dobija se smeša etanola od 92,5 % u parnoj fazi, dok je sadržaj etanola na dnu rektifikacione kolone 0,31 %. Samo 0,6 % etanola se gubi u ovoj operaciji.

Isparenja sa vrha rektifikacione kolone se uvode na adsorpcionu jedinicu molekularnih sita. Adsorpciona kolona uklanja 95 % vode (Aden i sar., 2002). Čist etanol (99,6 %) se hladi u razmenjivaču toplote, sa površinom za prenos toplote od 280 m² i konačno uvodi u skladište. Sredstvo za prenos toplote je rashlađena voda (5 °C), dok je koeficijent prenosa toplote 860,44 W/m²·K.

Skruber zapremine 25 500 L (visina 12,8 m i prečnik 1,6 m) se koristi za uklanjanje etanola i vode iz gasnih ispusta fermentacije i destilacije, sa ciljem izdvajanja čistog CO₂. Džibra iz destilacione kolone se koncentruje u uparivaču sa površinom za prenos toplote od 75,6 m² i zasićenom parom kao sredstvom za prenos toplote, uklanjajući preko 90 % vode, koja se kasnije koristi kao procesna voda nakon kondenzacije. Deo biomase koji se šalje na sušenje se pre operacije sušenja meša sa sirupom dobijenim nakon uparavanja (protok 22 400 kg/h). Sušenje se izvodi u rotirajućem bubnju sa kapacitetom sušenja od 996 kg/h, površinom bubnja 85,5 m² i vazduhom kao gasom za sušenje (Kwiatkowski i sar., 2006). Sadržaj dna rektifikacione kolone i molekularnih sita se mešaju protokom 59 000 kg/h i nakon toga mešaju sa kondenzatom isparenja iz skrubera dajući 280 000 kg/h procesne vode za ponovnu upotrebu u procesu. Jedan deo (15 000 kg/h) ove vode se ponovo koristi u skruberu, dok se ostatak koristi za razblaživanje koncentrovanog soka iz skladišta za potrebe procesa fermentacije.

Osnovna projektovana produktivnost postrojenja je 34,8 miliona kg (44 miliona L) 99,6 % etanola na godišnjem nivou, koji se proizvodi iz 564 000 t soka iz skladišta. Model troškova odražava ekonomske uslove za drugi deo 2014 godine.

5.5.2.3. Analiza bioprocesa

Ekonomska analiza je izvedena za predloženi model bioprocesa i prikazana je kao izveštaj indeksa samog projekta. Analiza nesigurnosti je takođe izvršena za ovaj model bioprocesa za različite cene sirovine (šećerne repe) i kvasca. Cene šećerne repe koje su odabrane za u ovom radu su se kretale u opsegu 0,017-0,029 \$/kg. Ovaj opseg je odabran zbog fluktuacija u kupovnoj ceni šećerne repe u periodu od 2000-2009 (Price Report, 2010). Cena kvasca zavisi od potrebnih količina, tako da je kupovna cena ponuđena od strane domaćih proizvođača i prodavaca kvasca varirala u opsegu 1,14-1,43 \$/kg. Na kraju, ispitan je uticaj količine recirkulacije biomase na ekonomske parametre.

5.5.2.4. Ekonomska analiza

Rezultati ekonomske analize su prikazani u tabeli 5.10. Pojedinačne komponente analize (kapitalni troškovi ulaganja, operativni i jedinični troškovi proizvodnje) diskutovani su u narednom delu teksta.

Ukupni kapitalni troškovi ulaganja u jedno ovakvo postrojenje su izračunati sabiranjem vrednosti za direktan fiksni kapital (DFK), radni kapital i troškove pokretanja i validacije fabrike. DFK predstavlja sumu ukupne cene postrojenja (UCP) i troškova za naknadu izvođačima i neplaniranih troškova (NIN). Dalje, UCP se dobija iz ukupne direktne cene postrojenja (UDCP) i ukupne indirektno cene postrojenja (UICP). Dok UICP zavisi od troškova vezanih za inženjerstvo i izgradnju, troškovi vezani za UDCP uključuju kupovinu opreme, instalacije, cevovode, instrumentaciju, izolaciju, struju, građevine, prilagođavanje okoline i pomoćne objekte. Cena kupovine većih delova opreme data u tabeli 5.10 je dobijena na osnovu ponuda dobavljača opreme ili iz izveštaja Aden i sar. (2002). Ako se veličina opreme u modelu nije slagala sa veličinom opreme ponuđenom od strane dobavljača, cena opreme je korigovana primenom pravila prikazanog jednačinom 21 (Dysert, 2003):

$$C_B = C_A \cdot \left(\frac{S_B}{S_A} \right)^{0,6} \quad (21)$$

gde C_B predstavlja procenjenju cenu (\$) opreme veličine S_B (L, m³, itd.), a C_A je poznata cena (\$) opreme odgovarajuće veličine S_A (iste jedinice kao S_B). Pored veličine, vrsta konstrukcionog materijala i specifične karakteristike opreme znatno utiču na troškove kupovine opreme (Nghiem i sar., 2011).

Procenjeni kapitalni troškovi za ovaj model iznose 68 778 000 \$, što je preko 20 miliona \$ više od kapitalnih troškova definisanih za proizvodnju etanola iz kukuruza od strane Kwiatkowski i sar. (2006). Ova razlika postoji jer je ova grupa autora upotrebila iskustvo iz industrije da troškove ukupnih kapitalnih ulaganja odrede kao trostruko veću vrednost sume troškova kupovine opreme i njene instalacije. Primenom identične metode proračuna kao Kwiatkowski i sar. (2006) na ovaj model, podaci o kapitalnim troškovima bi bili identični, odnosno troškovi kapitalnih ulaganja bi bili isti.

Tabela 5.10. Ekonomska analiza predloženog modela bioprocesa iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe

Troškovi kapitalnih ulaganja (\$)	68 778 000
Direktni fiksni kapital DFK = UCP+NIN (\$)	64 080 000
Ukupna cena postrojenja UCP = UDCP+UICP (\$)	55 722 000
Ukupna direktna cena postrojenja UDCP (\$)	34 826 000
Troškovi kupovine opreme (\$)	10 896 000
Fermentori (\$)	3 000 000
Disk centrifuga (\$)	1 475 000
Destilaciona kolona (\$)	478 000
Skruber (\$)	57 000
Rektifikaciona kolona (\$)	525 000
Molekulska sita (\$)	2 700 000
Uparivači (\$)	548 000
Sušnica (\$)	966 000
Kondenzator (\$)	57 000
Nenavedena oprema (\$)	1 090 000
Instalacija (\$)	4 644 000
Cevovodi (\$)	3 269 000
Instrumentacija (\$)	4 141 000
Izolacija (\$)	327 000
Elektro-instalacije (\$)	1 090 000
Građevine (\$)	4 685 000
Poboljšanje okoline (\$)	1 634 000
Pomoćni objekti (\$)	4 141 000
Ukupna indirektna cena postrojenja UICP (\$)	20 896 000
Inženjerstvo (\$)	8 707 000
Izgradnja (\$)	12 189 000
Troškovi naknade izvođačima i neplanirani NIN (\$)	8 358 000
Naknada izvođačima (\$)	2 786 000
Neplanirani troškovi (\$)	5 572 000
Radni kapital (\$)	1 494 000
Troškovi pokretanja i validacije (\$)	3 204 000
Operativni troškovi (\$/god)	20 982 000
Sirovine (\$/god)	2 037 000
Kvasac (\$/god)	424 000
Hranljiva podloga (\$/god)	1 612 000
Objekti (\$/god)	7 068 200
Radna snaga (\$/god)	6 968 100
Laboratorija/kontrola i obezbeđenje kvaliteta (\$/god)	278 500
Komunalije (\$/god)	7 427 200
Struja (\$/god)	4 118 600
Para (\$/god)	995 600
Rashlađena voda (\$/god)	2 313 000
Nusproizvodi (CO ₂ i hrana za stoku) (\$/god)	-2 797 000
Jedinična cena proizvodnje (\$/kg)	0,603

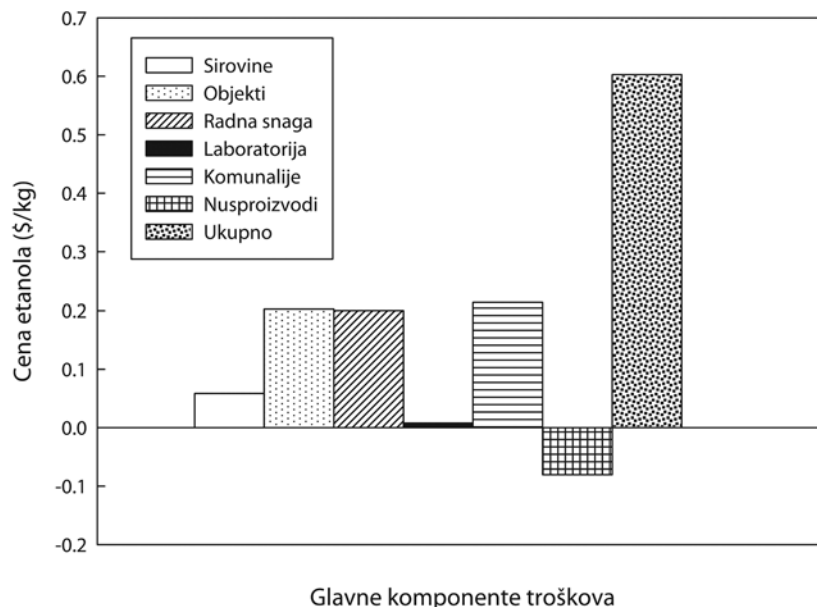
Operativni troškovi su izračunati sabiranjem troškova vezanih za sirovine i komunalije, troškove vezane za objekte (dostupnost opreme, održavanje, osiguranje, lokalne takse, itd.) troškove radne snage i laboratorije, kontrole i obezbeđenja kvaliteta, i oduzimanjem vrednosti od prodaje nusproizvoda (tabela 5.10). U poređenju sa godišnjom proizvodnjom etanola iz melase (Sobočan i Glavič, 2000), operativni troškovi proizvodnje etanola u ovom modelu su nešto niži. Ova razlika postoji usled činjenice da je melasa nusproizvod tehnologije proizvodnje šećera, a ekstrakcioni, retki i gusti sok su međuproizvodi pomenute tehnologije, odnosno melasa se dobija iz ekstrakcionog soka nakon njenog prečišćavanja (mikro- i ultrafiltracije – retki sok), koncentrovanja (uparavanjem – gusti sok) i višetepenom kristalizacijom. Drugim, rečima, operativni troškovi su veći kod proizvodnje etanola iz melase upravo zbog ovih dodatnih operacija.

Primarna sirovina za ovaj model jesu ekstrakcioni, retki ili gusti sok. Kvasac, koji fermentiše glukozu do etanola i CO₂, takođe je neophodan. Potrebne količine ovih i ostalih materijala su dobijene iz modela bioprocasa i njihove cene su ubačene u model. Informacije o pojedinačnim cenama sirovina dobijene su iz Republičkog Zavoda za Statistiku Republike Srbije.

Struja, para i rashlađena voda su komunalije potrebe u ovom procesu. Potrebe za komunalijama pojedinih komada opreme su izračunate i sumirane unutar programa. Ove komunalije su posmatrane kao kupovne komunalije, a cene za svaku od njih je zasnovan na petogodišnjem proseku tržišnih cena. Petogodišnji prosek cena (2005-2009) za paru (2,1 \$/t), rashlađenu vodu (0,3 \$/t) i struju (0,1 \$/kWh) dobijeni su iz godišnjih Izveštaja Elektroprivrede Srbije i upotrebljeni u modelu bioprocasa.

Proizvodi su dobijeni konverzijom hranljive podloge u etanol. To su etanol kao glavni proizvod, hrana za stoku i CO₂ kao nusproizvodi. Etanol se može prodati kao zamena ili u smeši sa fosilnim gorivima. Njegove cene su dostupne u Biomass Action Plan (2010). Predpostavljena cena etanola u ovom radu je 0,75 \$/kg (~0,59 \$/L). Hrana za stoku se može prodati i njena cena isključivo zavisi od sadržaja proteina i usko je povezana sa vrednostima drugih hrana za stoku na bazi proteina. Hrana za stoku dobijena u ovom bioprocasu ima sadržaj proteina približno 21 % i na osnovu toga njena prodajna cena je procenjena na 0,07 \$/kg (Belyea i sar., 2004). Drugi nusproizvod, ugljendioksid, se može prodati nekoj trećoj stranci za dalju preradu, prečišćavanje i distribuciju prehrambenim kompanijama i proizvođačima gaziranih pića. U ovom slučaju prodajna cena ovog nusproizvoda je 15 \$ po toni prodatog CO₂ (Kwiatkowski i sar., 2006).

Troškovi proizvodnje etanola, prikazani na slici 5.38, razloženi su na osnovne komponente ovog modela. Može se uočiti da su troškovi proizvodnje etanola približno 0,603 \$/kg, što odgovara rezultatima izveštaja Sobočan i Glavič (2000). Na slici 5.38 se takođe može uočiti da prihodi od prodaje hrane za stoku smanjuju troškove proizvodnje etanola i da predstavljaju značajan faktor u operativnim troškovima. S ozirom da cena šećerne repe varira usled tržišnih i klimatsih promena, uticaj cene šećerne repe je ispitan u analizi nesigurnosti.



Slika 5.38. Glavne komponente troškova proizvodnje etanola

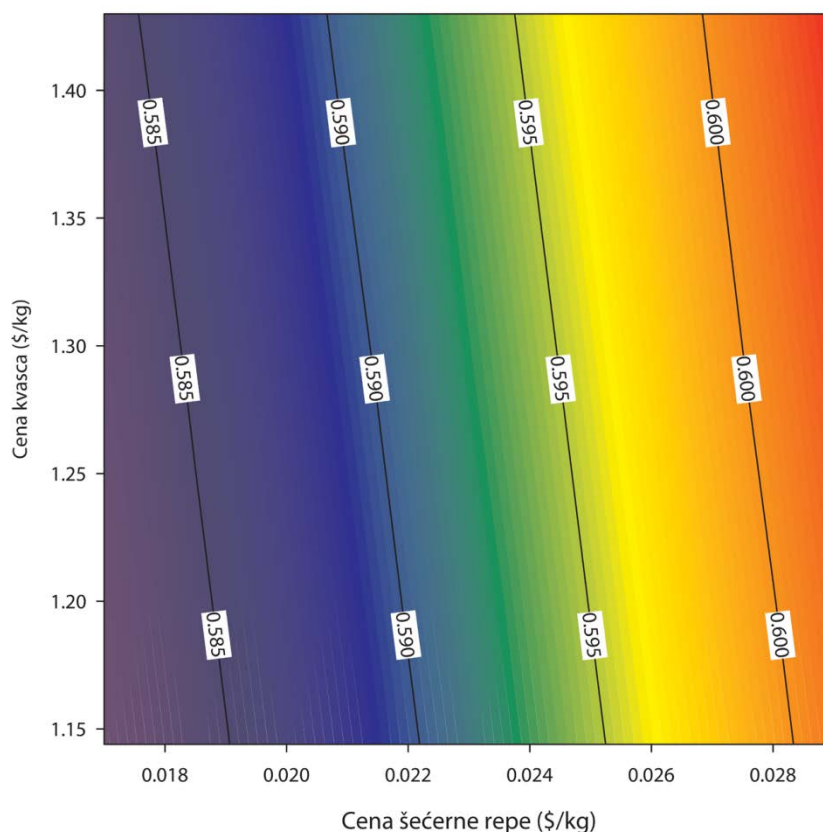
5.5.2.5. Analiza nesigurnosti

Za ovaj model bioprocesa simulacioni program je dao izveštaj o indeksima projekta prikazanim u tabeli 5.11. Bruto marža predstavlja razliku ukupnih prihoda od prodaje glavnog proizvoda i troškova prodane robe, podeljenu sa ukupnim prihodima i sve to izraženo u procentima. Ovaj broj predstavlja udeo svakog dolara prihoda koji kompanija zadržava kao čistu zaradu. Za ovaj bioproces bruto marža iznosi 18.01 % što znači da kompanija zadržava 0,18 \$ od svakog dolara prodane robe. Povrat na investiciju (PNI) je mera performanse koja se koristi za ocenu efikasnosti investicije. PNI je veoma popularan pokazatelj zbog svoje prilagodljivosti i jednostavnosti. Drugim rečima, ako PNI nema pozitivnu vrednost, onda u dati projekat ne treba vršiti investiciju. Vreme potrebno da se vrata troškovi uloženi u neki projekat mogu se izračunati na osnovu PNI. Tabela 5.11 prikazuje da je vreme potrebno za povrat uloženog približno 7,5 godina, što je sasvim zadovoljavajuće. Neto sadašnja vrednost (NSV) predstavlja razliku između trenutne vrednosti priliva novca i trenutne vrednosti odliva novca. Ona se koristi za analizu profitabilnosti investicije razmatranjem vremena-vrednosti zarađenog novca, jer dolar zarađen za 5 godina ima nižu vrednost nego dolar zarađen odmah (Heinzle i sar. 2006). Ako je NSV ispitivanog projekta pozitivna vrednost (kao u tabeli 5.11) uz pretpostavljeni popust na kamatu od 7 %, onda dati projekat treba realizovati. Interna stopa prinosa (ISP) je kamatna stopa koja se koristi u ekonomskim proračunima i koja izjednačava NSV svih protoka novca nekog projekta jednakim nuli. Drugim rečima, što je ISP veća, to je poželjnije uložiti u projekat. Ovaj model ima ISP od 7,73 %, sa porezom na dobit od 40 %. Na osnovu prikazanih rezultata, sa životnim vekom od 25 godina i periodom amortizacije 10 godina, ovaj projekat predstavlja veoma atraktivnu investiciju, odnosno ispitani sistem je ekonomski gledano veoma vijabilan.

Tabela 5.11. Ekonomski indeksi projekta proizvodnje etanola

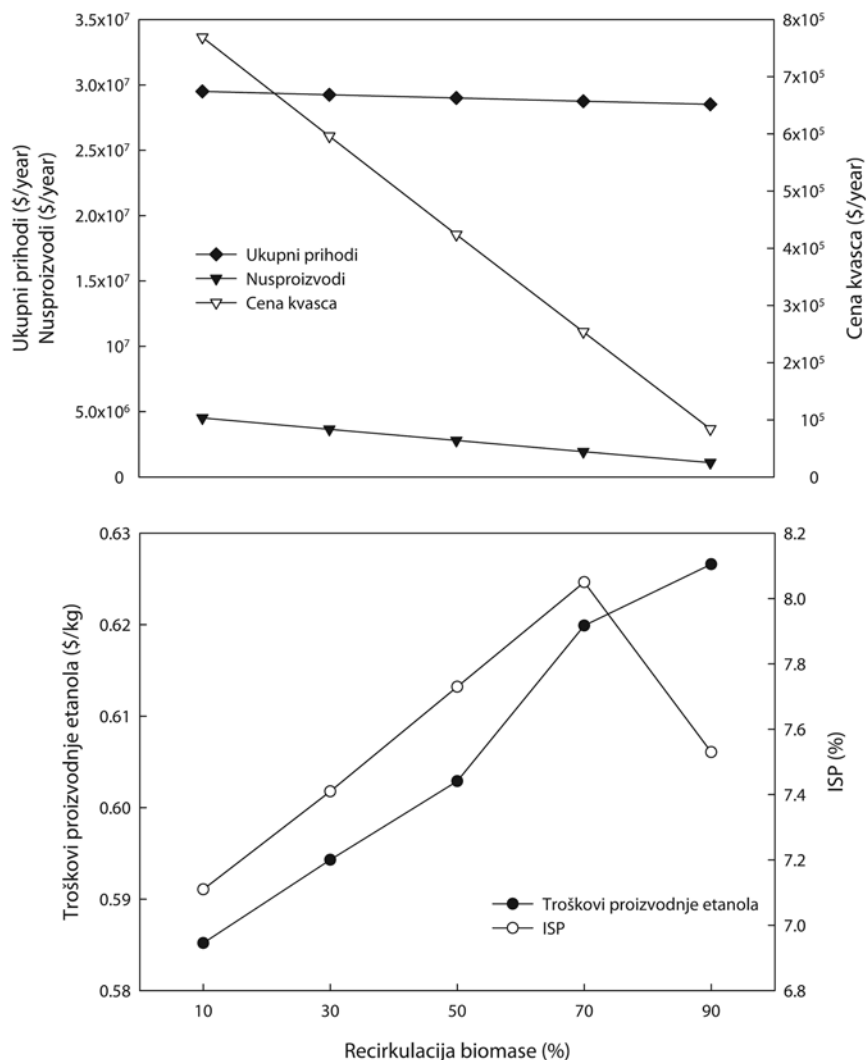
Indeksi projekta	Vrednosti
Bruto marža (%)	18,01
Povrat na investiciju (%)	13,41
Povrat uloženog novca (god)	7,46
Interna stopa prinosa (%)	7,73
Neto sadašnja vrednost (\$)	2 955 000

Uticaj cene šećerne repe i kvasca na troškove proizvodnje etanola su prikazani na slici 5.39. Može se uočiti da niže cene šećerne repe i kvasca daju manje troškove proizvodnje etanola. Takođe, cena šećerne repe ima znatno veći uticaj na troškove proizvodnje.

**Slika 5.39.** Uticaj cene šećerne repe i kvasca na troškove proizvodnje etanola

U zavisnosti od uslova na tržišti rukovodstvo postrojenja može da reguliše faktor podele i odluči koja količina biomase ide na sušenje (hrana za stoku) ili vraća nazad na fermentaciju nakon centrifugiranja. Uticaj faktora podele biomase na ekonomske parametre je prikazan na slici 5.40. Recirkulacijom veće količine biomase smanjuje količine sveže biomase potrebne za fermentaciju što smanjuje troškove kupovine kvasca (iako je cena za kupovinu manjih količina veća). Ipak, ukupni prihodi variraju samo za 1 milion \$ na godišnjem nivou u zavisnosti od faktora podele.

Međutim, troškovi proizvodnje etanola su veći sa porastom reciklirane biomase. Zbog većeg nagiba krive za troškove proizvodnje etanola u opsegu faktora podele od 50 do 70 % i na osnovu najvećih vrednosti ISP, ovaj opseg se smatra optimalnim za variranje faktora podele biomase.

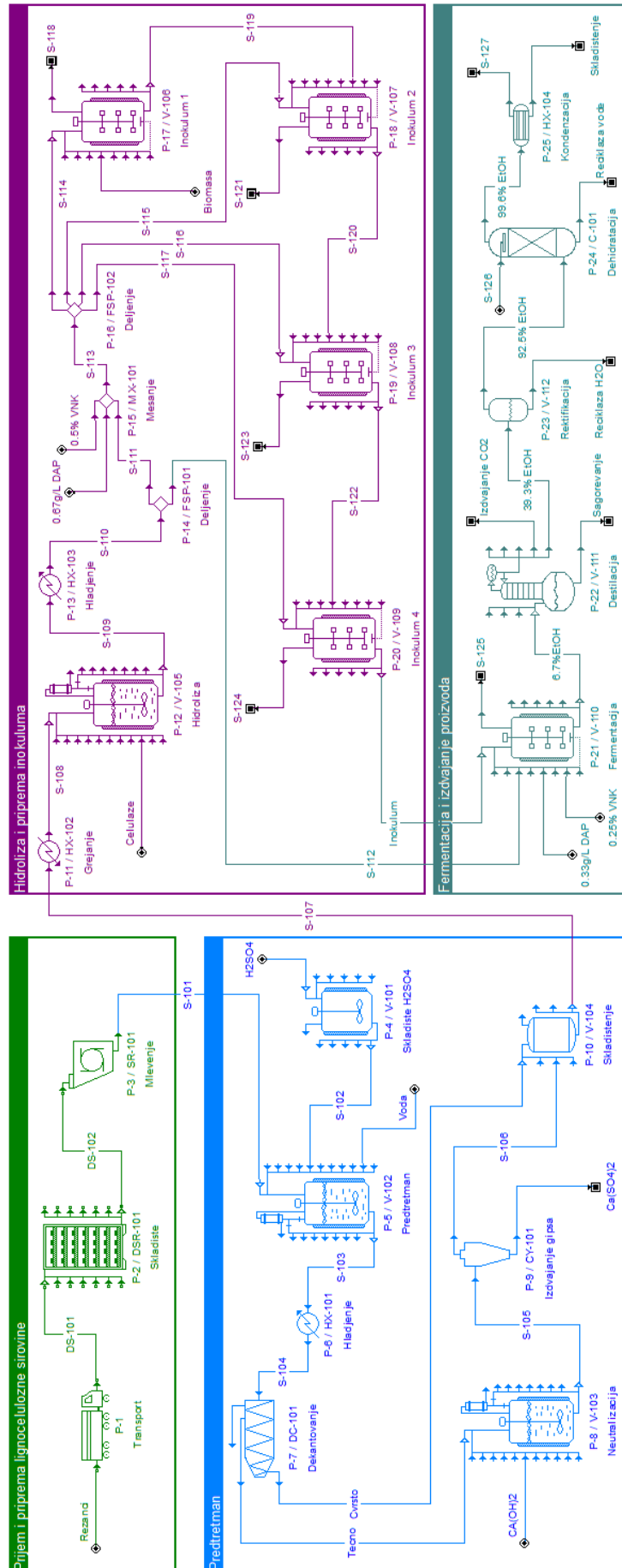


Slika 5.40. Uticaj recirkulacije biomase na ekonomske parametre procesa

5.5.3. Model proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca

U ovom delu razvijen je procesni i ekonomski model za konvencionalno postrojenje proizvodnje etanola sa ciljem primene istog u oceni novih tehnologija i proizvoda na bazi lignoceluloznih sirovina. Celokupan dijagram toka procesa proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca prikazak je na slici 5.41.

Izluženi repini rezanci se dovoze do fabrike pomoću kamiona i skladište do upotrebe. Iz skladišta izluženi repini rezanci idu na usitnjavanje gde se melju do odgovarajuće veličine, optimalne za dalji deo procesa.



Slika 5.41. Dijagram toka predloženog modela proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca

Savlemeni repini rezanci se šalju na predtretman, konverziju hemiceluloze i malog dela celuloze do rastvorljivih šećera, primenom razblažene sumporne kiseline i visoke temperature. Pod ovim uslovima deo lignina se takođe rastvara, što poboljšava efikasnost naknadne enzimske hidrolize celuloze. Smeša se nakon predtretmana hladi i tečni deo koji sadrži sumpornu kiselinu se odvaja od čvrste faze. U tečnu frakciju se dodaje $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sa ciljem neutralizacije rastvora i stvaranja gipsa ($\text{Ca}(\text{SO}_4)_2$) koji formira talog. Gips se odvaja filtracijom a tečni deo (filtrat) se ponovo meša sa čvrstom fazom pre hidrolize.

Enzimska hidroliza se izvodi odvojeno od fermentacije, što omogućava da se ovaj proces izvede na nešto povišenoj temperaturi, čime se smanjuje vreme i količina potrebnih enzima i povećava enzimski aktivnost. Veći broj sudova je na raspolaganju za ovaj proces. Enzimski preparat koji se koristi za hidrolizu celuloze sastoji se od sledećih enzima: endglukanaze, egzoglukanaze i β -glukozidaze.

Za fermentaciju, kao biokatalizator koristi se kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji će fermentisati glukozu do etanola i drugih proizvoda. Proizvodni mikroorganizam se mora umnožiti do količine za inokulaciju proizvodnog bioreaktora. Ovo se obavlja u seriji manjih bioreaktora. U hidrolizat izluženih repinih rezanaca se dodaju nutrijenti, kako bi se dobila hranljiva podloga za pripremu inokuluma. Celokupan sadržaj bioreaktora se koristi za inokulaciju sledećeg u seriji bioreaktora za pripremu inokuluma. Ovakva serija povećanja razmera se izvodi dok se ne postigne željena količina inokuluma za proizvodni bioreaktor.

Hidrolizat izluženih repinih rezanaca, nutrijenti i inokulum se uvode u glavni bioreaktor. Pet sudova koji rade u kaskadi se koriste za fermentaciju hidrolizata do etanola. Fermentaciona tečnost, koja sadrži etanol, dalje se šalje na izdvajanje i prečišćavanje proizvoda.

Destilacija i molekulska sita se koriste za izdvajanje etanola iz sirove fermentacione tečnosti i dobijanje 99,6% etanola. Destilacija se izvodi u dve kolone. Prva kolona uklanja rastvoreni CO_2 i većinu vode, dok druga (rektifikaciona) kolona koncentriše rastvor etanola do blizu azeotropne smeše. Sva voda iz ove smeše se uklanja adsorpcijom u parnoj fazi na molekulskim sitima. Konačno, 99,6 % para etanola se hladi u razmenjivaču toplote, kondenzuje i skladišti do upotrebe ili prodaje.

5.5.3.1. Maseni i energetski bilansi

Količina izluženih repinih rezanaca potrebnih za jednu šaržu u ovom procesu iznosi 19 600 kg, prema podacima analize dostupnosti ove sirovine na našem tržištu kao i broja šarži koje su moguće na godišnjem nivou. Transportni kamioni imaju kapacitet 10 tona, što znači oko 1500 isporuka je potrebno u toku godine.

S obzirom da se šećerna repa vadi samo u kratkom periodu u toku godine, neophodno je dugoročno skladištenje kako bi se obezbeio konstantan izvor sirovine u postrojenju. Dugoročno skladištenje može biti u obliku prekrivenih skladišta sa stalcima blizu samog postrojenja.

Iz skladišta izluženi repini rezanci se uvode u mlin, gde se smanjuje njihova veličina na onu koja pogoduje predtretmanu i hidrolizi. Operativni protok mlina je 78,400 kg/h, vreme rada 15 min a potrošnja energije 3 920 kW.

Samleveni repini rezanci se prebacuju u dva reaktora za predtretman pre dodavanja vode i sumporne kiseline. Koncentrovana sumporna kiselina se rastvara kako bi se postigla krajnja optimalna koncentracija kiseline u reaktoru, definisana u ovom radu. U ovom momentu smeša sadrži 30 % nerastvornih čvrstih materija. Reaktori za predtretman rade na povišenoj temperaturi sa vremenom zadržavanja definisanim u delu optimizacije predtretmana izluženih repinih rezanaca u ovom radu. Zapremina svakog reaktora iznosi 33,5 m³ (visina 6,44 m i prečnik 2,58 m). Para visokog pritiska se koristi kao sredstvo za prenos toplote sa protokom od 670 564 kg/h. Tabela 5.12 prikazuje reakcije, sa odgovarajućim stepenima konverzije, koje se odvijaju u reaktorima za predtretman.

Tabela 5.12. Reakcije predtretmana i odgovarajući stepeni konverzije

Reakcija	Reaktant	Stepen konverzije (%)
$(\text{Glukan})_n + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{Glukoza}$	Glukan	7,7
$(\text{Glukan})_n + 1/2n\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/2n\text{Celobioza}$	Glukan	0,7
$(\text{Ksilan})_n + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{Ksiloz}$	Ksilan	92,5
$(\text{Arabinan})_n + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{Arabinoza}$	Arabinan	92,5
$(\text{Lignin})_n \rightarrow n\text{Rastvorljiv Lignin}$	Lignin	5

Smeša koja napušta reaktore za predtretman se hladi na 50 °C pomoću vode za hlađenje u razmenjivaču toplote sa površinom za razmenu toplote od 85,8 m² jer se operacija neutralizacije smeše odvija na ovoj temperaturi. Nakon 10 min u razmenjivaču toplote pretretirana smeša sa 22 % nerastvornih čvrstih supstanci se uvodi u centrifugu tipa dekantera za razdvajanje čvrste faze od tečne. Zapreminski protok ove jedinice opreme je 370 000 L/h a vreme trajanja operacije je 10 min. Razlog odvajanja tečnosti je smanjenje kiselosti (H₂SO₄) tečne faze, čime se pospešuje proces fermentacije.

Nakon razdvajanja tečna faza se neutrališe. Oko 540 kg Ca(OH)₂ se dodaje u tečnu frakciju i drži 1 h, što je dovoljno vremena za formiranje kristala gipsa. Potreban broj i veličina sudova za ovo je 2 i 28 200 L (6 m visina i 2,5 m prečnik), redosledom, dok je potrošnja snage za mešanje 98,5 W/m³. Formirani kristali se odvajaju u hidrociklonu, koji ima sledeće karakteristike: brzina fluida na ulazu 5 m/s, pad pritiska 1,1977 bar, snaga 6,759 kW, protok 202 804 L/h, dužina 4,2 m i prečnik na ulazu 0,12 m. Hidrociklon uklanja 99,5 % nastalih kristala gipsa, a izdvojeni kristali sadrže 17 % tečne faze. Pri sadržaju suve materije od 83 %, gipsom se može rukovati kao sa čvrstom supstancom. Nakon uklanjanja gipsa, neutralizovana tečnost se ponovo meša sa čvrstom frakcijom iz predtretmana u sudu za skladištenje. Snaga za mešanje ovih sudova je 394 W/m³. Broj potrebnih sudova je 2 a njihova zapremina 34 500 L.

Neutralizovana i pretretirana smeša sa 22 % čvrstih susptanci se uvodi u razmenjivač toplote sa površinom za razmenu toplote od 45,3 m², koji zagreva ovu smešu do 65 °C, odnosno temperaturu hidrolize, primenom pare niskog pritiska, čiji je ptorok 11 300 kg/h) pre uvođenja u sudove za hidrolizu.

Hidroliza se odvija u pet 77 500 L (8,5 m visina i 3,5 m prečnik) sudova koji rade u kaskadi. Vreme trajanja ove procedure je 36 h. Za ovaj model definisan je napoj celulaza od 12 IFPU/g celuloze (IFPU – *Internatioanl Filter Paper Unit*), odnosno predpostavljena je koncentracija enzima od 50 FPU/mL. Tabela 5.13 prikazuje reakcije i njihove stepene konverzije za proces hidrolize. Hidrolizat izluženih repinih rezanaca nakon procesa hidrolize sadrži 15,3 % redukujućih šećera.

Tabela 5.13. Reakcije hidrolize i odgovarajući stepeni konverzije

Reakcija	Reaktant	Stepen konverzije (%)
$(\text{Glukan})_n + 1/2n\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/2n\text{Celobioza}$	Glukan	1,2
$(\text{Glukan})_n + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{Glukoza}$	Glukan	90
$\text{Celobioza} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Glukoza}$	Celobioza	100

Hidrolizat izluženih repinih rezanaca se hladi do 30 °C u razmenjivaču toplote sa površinom za razmenu toplote od 80 m² i nakon toga se deo (10 % šalje u sekciju proizvodnje inokuluma dok se ostatak koristi u fermentaciji. Definisana zapremina inokuluma je 10 % i za fazu pripreme inokuluma i za proces fermentacije. Broj fermentora u delu prirpeme inokuluma je 4 i za svaki postoji po još jedan rezervni u slučaju kvara, kontaminacije ili održavanja. Sadržaj nutrijenata koji se dodaju u hidrolizat repinih rezanaca u sekciji pripreme inokuluma su 0,5 % vode od namakanja kukuruza (VNK) i 9,67 g/L diamonijum fosfata (DAP). Količina biomase za prvi fermentor u prirpemi inokuluma je oko 0,7 kg. Rast biomase, sinteza proizvoda (etanola) i utrošak supstrata tokom pripreme inokuluma i fermentacije opisani su modelima definisanim u prethodnom delu ovog rada. Vreme kultivacije svakog od bioreaktora u delu pripreme inokuluma je 24 h. Nakon prve fermentacije u pripremi inokuluma, celokupan sadržaj se koristi kao inokulum za naredni bioreaktor i tako sve dok se ne postigne željena količina biomase za inokulaciju proizvodnog (glavnog) fermentora.

Definisanjem da je radna zapremina u odnosu na zapreminu bioreaktora 90 %, zapremine istih u sekciji prirpeme inokuluma su sledeće: 10, 100, 1000 i 10 000 L. Dobijene vrednosti potrošnje energije za iste je: 0,75, 3,7, 18,6 i 90 kW. Potrebne količine vode za hlađenje ovih fermentora su: 128, 635, 3 200, 15 500 kg/h.

Fermentacija se odvija u pet 90 000 L (10 m visina i 3,3 m prečnik) sudovima. Vreme fermentacije je 36 h. Deo hidrolizata koji nije upotrebljen u pripremi inokuluma je obogaćen sa 0,25 % VNK i 0,33 g/L DAP. Koncentracija etanola u fermentacionoj tečnosti nakon procesa je 6,7 % dok je koncentracija šećera 0,8 %.

Fermentaciona tečnost nakon bioprocesa se uvodi u destilacionu kolonu, čiji su operativni uslovi podešeni tako da se izdvaja CO₂ i što je moguće manje etanola na vrhu kolone, uz ukljanjanje 86 % vode pri dnu kolone. Refluksni odnos je 3:1. Sastav na vrhu kolone je 97,75 % CO₂, 2,21 % etanol i 0,04 % voda. Sav CO₂ i samo 0,97 % etanola napušta kolonu na vrhu suda. Preko 99 % etanola iz napoja se izvodi kao 39,3 % smeša etanola i vode.

Sadržaj dna destilacione kolone, zbog svog sastava, može se osušiti i spaliti ili direktno upotrebiti u postrojenju za proizvodnju biogasa. U oba slučaja, postrojenje za proizvodnju etanola može da smanji operativne troškove upotrebom obnovljivih izvora energije.

Smeša etanola i vode se izdvaja kao parna faza sa kolone i uvodi direktno na rektifikacionu kolonu koja ima radnu zapreminu od 1 650 L. Parna faza na vrhu rektifikacione kolone sadrži 92,5 % etanola, dok je sastav na dnu kolone 0,07 % etanola. Samo 0,1 % etanola iz napoja se gubi u ovoj operaciji.

Parna faza sa vrha rektifikacione kolone se uvodi u adsorpcionu jedinicu molekulskih sita. Adsorpciona kolona, zapremine 7 300 L, uklanja 95 % vode. Čist 99,6% etanol se hladi na 20 °C u razmenjivaču toplote sa površinom za razmenu od 72 m² i konačno uvodi u skladište. Sredstvo za prenos toplote je rashlađena voda.

Ekonomskom analizom dobijeni su ekonomski parametri neophodni za procenu isplativosti predloženog modela za proizvodnju etanola iz izluženih repinih rezanaca (tabela 5.14).

Tabela 5.14. Ekonomski parametri za model proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca

Parametar	Vrednost
Ukupna kapitalna ulaganja (\$)	81 280 000
Operativni troškovi (\$)	9 929 000
Produktivnost (kg/god)	3 549 049,66
Troškovi proizvodnje etanola (\$/kg)	2,8
Ukupni prihodi (\$/god)	25 106 000
Bruto marža (%)	60,45
Povrat na investiciju (%)	14,86
Povrat uloženog novca (god)	6,73
Interna stopa prinosa (%)	9,92
Neto sadašnja vrednost (\$)	10 727 000

6. ZAKLJUČAK

Istraživanja koja su obuhvaćena ovom disertacijom izvršena su u potpunosti uz korišćenje sirovinske baze dostupne na našem tržištu. Dobijeni rezultati mogu se rezimirati u okviru sledećih zaključaka:

- Rezultati analize sastava sirovina ukazuju da nusproizvod tehnologije prerade šećerne repe, odnosno izluženi repini rezanci imaju uobičajen sastav ugljenih hidrata (celuloze, hemiceluloze i saharoze), lignina, pepela, ukupnog azota i ekstrakata. Naveden supstrat, na osnovu sadržaja navedenih komponenti, zajedno sa međuproizvodima pomenute tehnologije (ekstrakcionim, retkim i gustim sokom) i nusproizvodom (melasom) predstavljaju pogodnu sirovinu za pripremu hranljive podloge za proizvodnju etanola.
- Ispitivanjem uticaja veličine čestica izluženih repinih rezanaca (manje od 180 μm , 180-250 μm i veće od 850 μm), koncentracije sumporne kiseline (1-4 %) i vremena predtretmana (30-120 min) na na količinu dobijenih redukujućih šećera i prinos etanola naknadnom fermentacijom, ustanovljeno je primenom metode odzivne površine i željene funkcije da se pod definisanim uslovima (maksimalno moguća koncentracija dobijenih fermentabilnih šećera, maksimalni prinos etanola, minimalan utrošak kiseline i minimalno vreme predtretmana) najbolji rezultati postižu pri koncentraciji sumporne kiseline od 1 % i vremenom predtretmana od 75 minuta.
- Eksperimentalno ispitana proizvodnja enzima, kultivacijom plesni *Trichoderma reesei* na različitim celuloznim supstratima (slama, piljevina topole i bukve, kukuruzovina, plevica i izluženi repini rezanci) primenom dve različite tehnike (submerzno i na čvrstim hranljivim podlogama), potvrdila je da je nusproizvod prerade šećerne repe najbolja sirovina za pripremu hranljive podloge za proizvodnju celulaza. Ujedno, tehnika kultivacije na čvrstim supstratima se pokazala kao daleko bolja opcija kada je u pitanju produkcija enzima.

- Ubacivanjem eksperimentalnih vrednosti za koncentraciju ćelija kvasca, redukujućih šećera i etanola u predložene kinetičke modele za rast biomase (logistička jednačina), potrošnju supstrata (*Pirt*-ova jednačina) i nastajanje proizvoda (modifikovana *Gompertz*-ova jednačina), redosledom, dobijeni su kinetički parametri za procese fermentacije među- i nusproizvoda prerade šećerne repe. Odličnim poklapanjem ($R^2 > 0,9$) modelom predviđenih kinetičkih parametara sa eksperimentalno utvrđenim vrednostima potvrđeno je da su predloženi modeli adekvatni za opis toka fermentacije među- i nusproizvoda za proizvodnju etanola.
- Na osnovu literaturnih podataka o proizvodnji šećerne repe i šećera u Republici Srbiji u poslednjih deset godina razvijen je model postrojenja za proizvodnju 44 miliona litara 99,6 % etanola na godišnjem nivou iz šećernih među- i nusproizvoda prerade šećerne repe uz minimalno generisanje otpada. Model je upotrebljen za proračun kapitalnih troškova ulaganja, troškova proizvodnje po jedinici proizvoda i operativnih troškova. U analizi nesigurnosti ispitan je uticaj cene sirovine (šećerene repe) i proizvodnog mikroorganizma (kvasca), kao i uticaj količine biomase koja se recirkuliše na ekonomske parametre procesa, troškove proizvodnje etanola i isplativost postrojenja. Rezultati su pokazali da cena šećerne repe ima značajan uticaj na troškove proizvodnje etanola. Takođe, ispostavilo se da je optimalan procenat recirkulisane biomase u opsegu 50-70 %.
- Model bioprocasa proizvodnje etanola iz izluženih repinih rezanaca generisan je na osnovu podataka dobijenih u ovom radu (optimizacije predtretmana i kinetičkih modela za rast biomase, nastajanje etanola i potrošnju susprata) i dostupne literature fermentaciji lignoceluloznih sirovina. Ekonomskom analizom je utvrđeno da je predloženi model ekonomski isplativ i da postoji opravdanost ulaganja u jedno ovakvo postrojenje.

7. LITERATURA

- Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., et al., 2002. Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover — NREL/TP-510-32438. Available from: http://butanol.com/docs/2002_NREL_Lignin.pdf. Accessed November 18, 2008. agranet.com, 2010. <http://www.agra-net.com/portal2/home.jsp>.
- Agriculture statistics of Statistical Office of the Republic of Serbia. Realized yield of late crops, plums and grapes in the Republic of Serbia, as of 10.11. 2010. Communication, Agriculture statistics. Number 330, Year LIX, 25.10.2011.
- Anderson, N., 2000. Practical process research & development. Academic Press. London.
- Andrić, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K., 2010a. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol. Adv.* 28, 308–324.
- Andrić, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K., 2010b. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 280–297.
- Antov, M., 2010. Bioseparaciono inženjerstvo. Tehnološki fakultet Novi Sad. Univerzitet u Novom Sadu.
- Arroyo-López, F.N., Orlić, S., Querol, A., Barrio, E., 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Inter. J. Food Microbiol.* 131, 120–127.
- Balat, M., 2007. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Explor. Exploit.* 25, 195–218.
- Balat, M., Balat, H., Cahide, O.Z., 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy. Combust.* 34, 551–573.
- Bansal, P., Hall, M., Realff, M.J., Lee, J.A., Bommaris, A.S., 2009. Modeling cellulose kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Adv.* 27, 833–848.
- Belyea, R.L., Rausch, K.D., Tumbleson, M.E., 2004. Composition of corn and distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. *Bioresour. Technol.* 94, 293–298.
- Biomass Action Plan, 2010. Serbian-Dutch government project on biomass and biofuels. Serbian Ministry of Infrastructure and Energy, (G2G08/SB/6/3).
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., Tjerneld, F., 2007. Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enz. Microb. Technol.* 41, 186–195.
- Bulletin 523, 2010. Agriculture 2009. Statistical Office of the Republic of Serbia. ISSN 0354-3641.
- Cadoche, L., Lopez, G.D., 1989. *Biol. Wastes* 30, 153–157.
- Cardona, C.A., Sanchez, O.J., 2007. *Bioresour. Technol.* 98, 2415–2457.
- Champagne, P., 2007. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: a Canadian perspective. *Canada Resour. Conserv. Recycling* 50, 211–230.
- Cortez, L.A.B., Lora, E.E.S., Go´mez, E.O., 2008. Biomassa Para Bioenergia. UNICAMP, Campinas.
- Dawson, L., Boopathy, R., 2007. *Bioresour. Technol.* 98, 1695–1699.

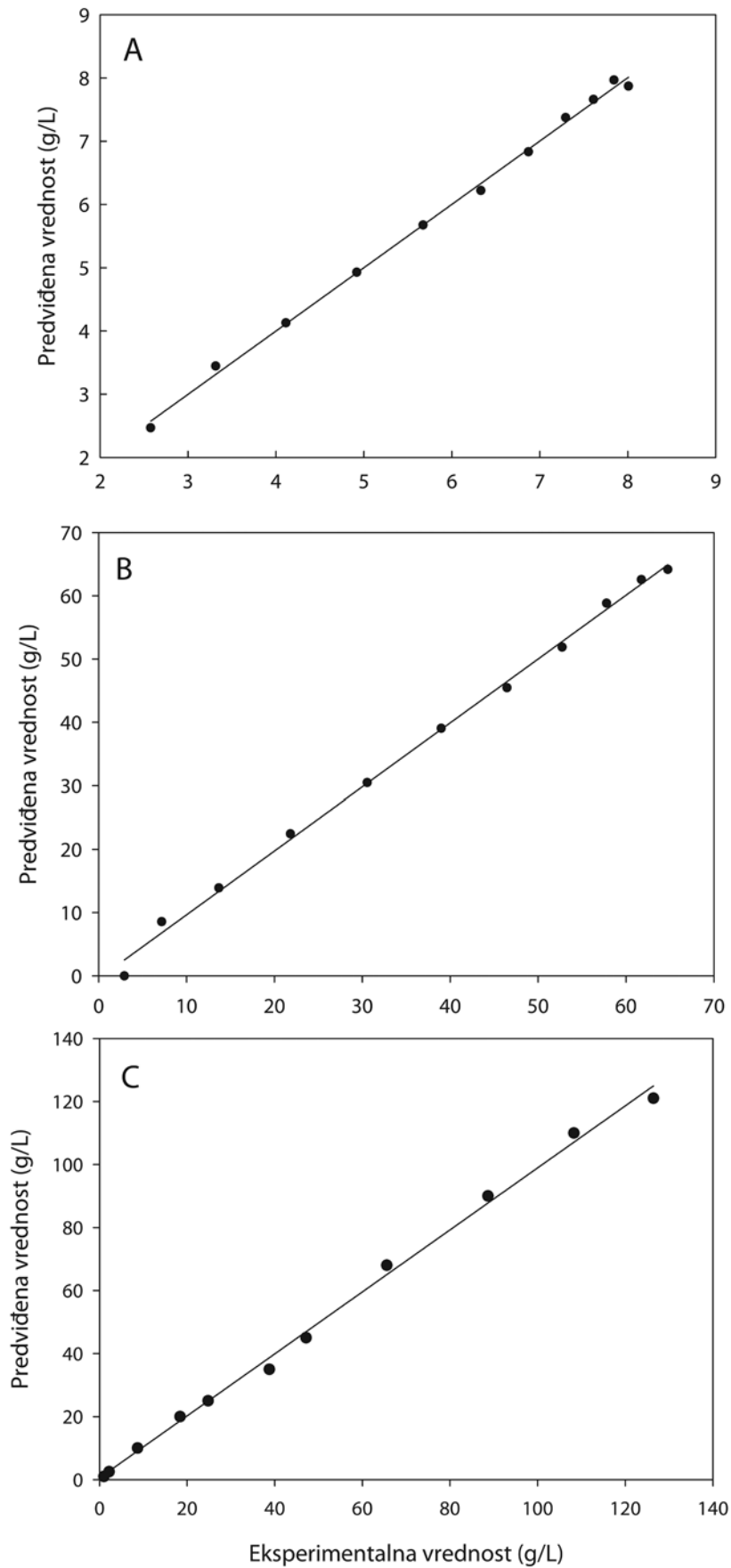
- Dimian, A., 2003. Integrated design and simulation of chemical processes. Elsevier, Amsterdam.
- Diwekar, U., 2014. Batch Processing: Modeling and Design. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Dodić, J., Grahovac, J., 2013. Industrijska mikrobiologija – praktikum. Tehnološki fakultet Novi sad. Univerzitet u Novom Sadu.
- Dodić, S., Popov, S., 2009. Bioreaktori. Tehnološki fakultet Novi Sad. Univerzitet u Novom Sadu.
- Dodić, S., Popov, S., 2011. Bioprocena oprema. Tehnološki fakultet Novi Sad. Univerzitet u Novom Sadu.
- Dodić, S., Popov, S., Dodić, J., Ranković, J., Zavargo, Z., Jevtić-Mučibabić, R., 2009. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing, *Biomass Bioenergy* 33, 822-827.
- Dodić, S.N., Vučurović, D.G., Popov, S.D., Dodić, J.M., Ranković, J.A., 2010. Cleaner bioprocesses for promoting zero-emission biofuels production in Vojvodina. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14, 3242-3246.
- Duff, S.J.B., Murray, W.D., 1996. *Bioresour. Technol.* 55, 1-33.
- Ergun, M., Ferda Mutlu, S., 2000. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.* 73, 251-255.
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A.G., Fenske, J.J., Penner, M.H., 1997. *Bioresour. Technol.* 59, 129-136.
- Faaij, A.P.C., 2006. Modern biomass conversion technologies. *Mitig. Adapt. Strat. Glob. Change* 11, 343-375.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., 1987. Cellulose hydrolysis, first ed Springer-Verlag, New York, NY.
- Fang, H., Xia, L., 2014. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. *Fuel* 143, 211-216.
- Gan, Q., Allen, S.J., Taylor, G., 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Proc. Biochem.* 38, 1003-1018.
- Ghasem, N., 2012. Computer Methods in Chemical Engineering. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Goldemberg, J., 2007. Ethanol for a sustainable energy future. *Science* 315, 808-810.
- Govindaswamy, S., Vane, L.M., 2007. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technol.* 98, 677-85.
- Grahovac, J., 2011. Optimizacija dobijanja etanola fermentacijom međuproizvoda tehnologije prerade šećerne repe. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Novi Sad. Univerzitet u Novom Sadu.
- Guragain, Y.N., De Coninck, J., Husson, F., Durand, A., Rakshit, S.K., 2011. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresour. Technol.* 102, 4416-4424.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C., 2005. *Biomass Bioenergy* 28, 384-410.
- Han, Y.J., Chen, H.Z., 2010. Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulose in lignocellulose hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 48, 218-224.
- Heinzle, A., Hungerbuhler, K., (1997). Intergrated process development: The key to future production of chemicals. *Chimia* 51, 176-183.
- Heinzle, E., Biwer, A., Cooney, C., 2006. Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment. John Wiley & Sons, Chichester.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10-18.
- Herlich, K., 1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington, VAA: AOAC.
- Hutnan, M., Drtil, M., Mrafkova, L., 2000. Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp. *Biodegrad.* 11, 203-211.
- IBGE, 2008. Brazilian Institute of Geography and Statistics [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE]. Evolução da Produtividade da Cana-de-Açúcar no Brasil. Available at/www.ibge.gov.brS.

- International Risk Governance Council, 2007. Governing the risks and opportunities of bioenergy. IRGC's Bioenergy Project, Geneva, Switzerland. August, Available at: [www.irgc.org/irgc/IMG/pdf/IRGC ConceptNote Bioenergy 1408S](http://www.irgc.org/irgc/IMG/pdf/IRGC_ConceptNote_Bioenergy_1408S.pdf).
- Ivetić, D., Ščiban, M., Antov, M. 2012. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar beet shreds: Statistical modeling of the experimental results. *Biomass Bioenerg.* 47, 387-394.
- Jobling, S., 2004. *Plant Biotechnol.* 7, 210–218.
- Jokić, A., 2010. Modelovanje "cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Kadam, K.L., Rydholm, E.C., McMillan, J.D., 2004. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Prog.* 20, 698–705.
- Khayet, M., Cojocar, C., Zakrzewska-Trznadel, G., 2008. Response surface modelling and optimization in pervaporation. *J. Membrane Sci.* 321, 272–283.
- Kootstra, A.M.J., Beeftink, H.H., Scott, E.L., Sanders, J.P.M., 2010. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochem. Eng. J.* 46, 126–131.
- Krajnc, D., Glavič, P., 2009. Assessment of different strategies for the co-production of bioethanol and beet sugar. *Chem. Eng. Res. Des.* 87, 1217-1231.
- Kühnel, S., Schols, H.A., Gruppen, H., 2011. Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: Examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnol. Biofuels* 4, 1-14.
- Kwiatkowski, J.R., McAloon, A.J., Taylor, F., Johnston, D.B., 2006. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Ind. Crops Prod.* 23, 288–296.
- Lee, S., Shah, Y.T., 2013. *Biofuels and Bioenergy: Processes and Technologies*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Leiper, K.A., Schlee, C., Tebble, I., Stewart, G.G., 2006. The fermentation of beet sugar syrup to produce bioethanol, *J. Inst. Brew.* 112, 122-33.
- Lewin, D., 2003. *Using process simulators in chemical engineering: A multimedia guide for the core curriculum*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Lima, L.R., Marcondes, A.A., 2002. *A lcool Carburante: uma estratégia brasileira*. Ed. UFPR, Curitiba. 248p.
- Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour. Technol.* 98, 3367–74.
- Linoj, K.N.V., Dhavala, P., Goswami, A., Maithel, S., 2006. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. *Asian Biotechnol. Develop. Rev.* 8, 31–49.
- Liu, Z., Antolli, P., 2012. *Bioreactors: Design, Properties and Applications*. Nova Science Publisher, Inc. New York.
- Lynd, L.R., Weimar, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–77.
- Lynd, L.R., Laser, M.S., Bransby, D., Dale, B.E., Davison, B., Hamilton, R., et al., 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat. Biotechnol.* 26, 169–172.
- Lynd, L.R., Larson, E., Greene, N., Laser, M., Sheehan, J., Dale, B.E., et al., 2009. The role of biomass in America's energy future: framing the analysis. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 3, 113–123. doi: 10.1002/bbb.
- McMillan, J.D., 1994. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, ACS Symposium Series, vol. 566. Pretreatment of lignocellulosic biomass. ACS, Washington, DC, pp. 292–324.
- Merino, S.T., Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 95-120.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., et al., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96(6), 673–686.

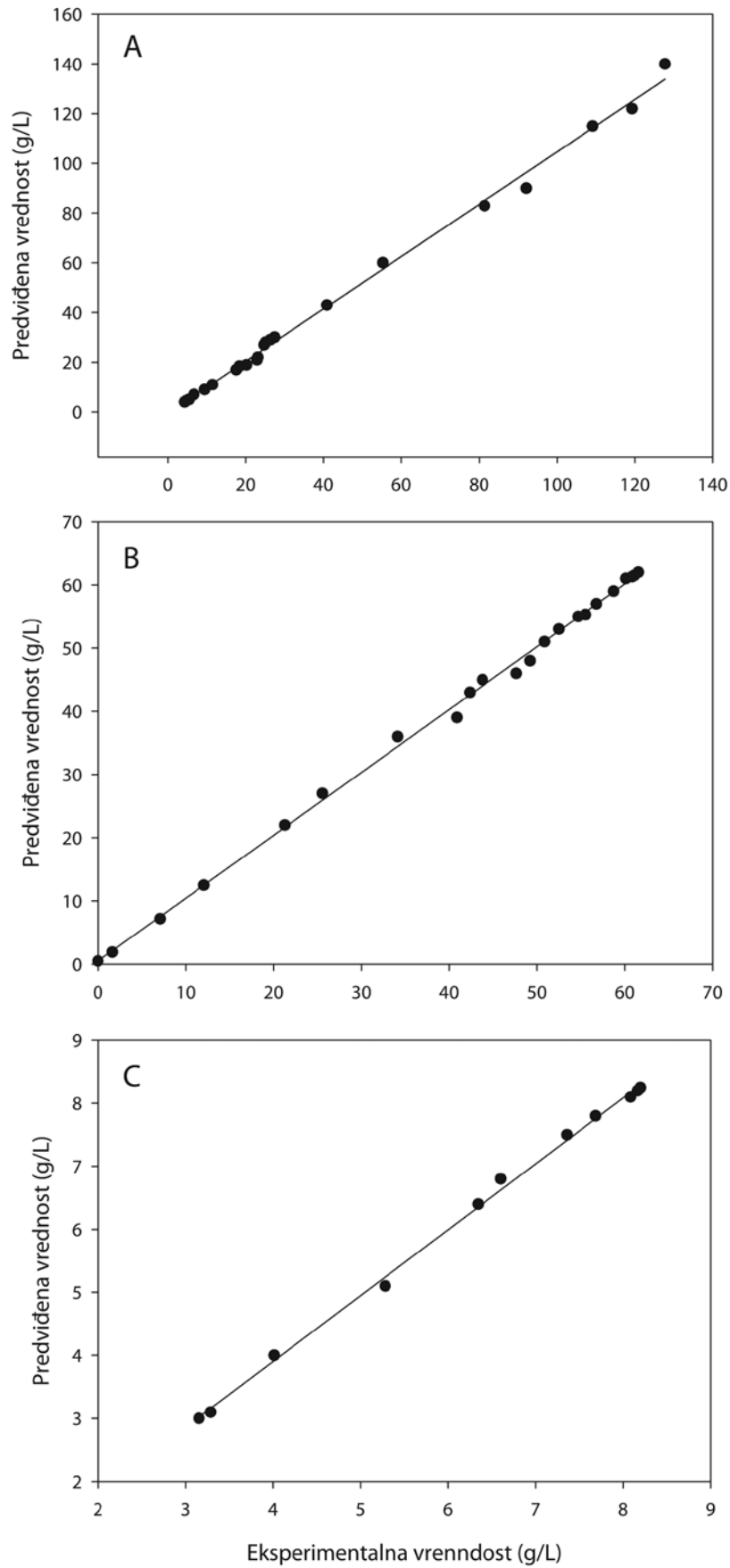
- Mu Y., Wang G., Yu H.Q., 2006. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour. Technol.* 97, 1302-1307.
- Nghiem, N.P., Ramirez, E.C., McAloon, A.J., Yee, W., Johnston, D.B., Hicks, K.B., 2011. Economic analysis of fuel ethanol production from winter hulled barley by the EDGE (Enhanced Dry Grind Enzymatic) process. *Bioresour. Technol.* 102, 6696-6701.
- NREL/TP-510-42618, 2010. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- NREL/TP-510-42619, 2008. Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- NREL/TP-510-42621, 2008. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- NREL/TP-510-42622, 2008. Determination of Ash in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- NREL/TP-510-42625, 2008. Determination of Protein Content in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- NREL/TP-510-42628, 2008. Measurement of Cellulase Activities. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- NREL/TP-510-48087, 2010. Summative Mass Closure. National Renewable Energy Laboratory. Washington, USA.
- Okazaki, M., Moo-Young, M., 1978. Kinetics of enzymatic-hydrolysis of cellulose — analytical description of a mechanistic model. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 637-663.
- Oliveria, M.E.D., Vaughan, B.E., Rykiel, E.J., 2005. Ethanol as fuel: energy, carbon 1239 dioxide balances, and ecological footprint. *Bioscience* 55, 593-602.
- Ohgren, K., Vehmaanpera, J., Siika-Aho, M., Galbe, M., Viikari, L., Zacchi, G., 2007. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (4), 607-613.
- Panda, T., 2011. *Bioreactors: Analysis and Design*. Tata McGraw Hill. New Delhi.
- Pazouki, M., Najafpour, G. and Hosseini, M.R., 2008. Kinetic models of cell growth, substrate utilization and bio-decolorization of distillery wastewater by *Aspergillus fumigatus* UB260. *Afr. J. Technol.* 7, 1369-1376.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., De-la-Rubia, T., Martinez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53-63.
- Petride, D., Koulouris, A., Siletti, C., 2002. Throughput analysis and debottlenecking of biomanufacturing facilities. *BioPharm* (Aug), 2-7.
- Pimentel, D., Marklein, A., Toth, M.A., Karpoff, M., Paul, G.S., McCormack, R., et al., 2008. Biofuel impacts on world food supply: use of fossil fuel, land and water resources. *Energies* 1, 41-78.
- Popov, S., Ranković, J., Dodić, J., Dodić, S., Jokić, A., 2010. Bioethanol Production from Raw Juice as Intermediate of Sugar Beet Processing: A Response Surface Methodology Approach. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 376-383.
- Power Industry of Serbia, Annual Reports from 2005 till 2009. Database at <http://www.eps.rs/Pages/FolderDocs.aspx?list=Godisnji%20Izvestaji>, accessed at June 2011.
- Price Report, 2010. Average annual purchase prices of agricultural products from 2000 until 2009. Statistical Office of the Republic of Serbia.
- Razmovski, R., Vučurović, V., 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 378-385.
- Report SRB233 PO15, 2011. Accomplished wheat yield and expected production of maize, sugar beet, sunflower and soybean in the Republic of Serbia for 2011. Statistical Office of the Republic of Serbia. ISSN 0353-9555.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J.R., Meyer, A.S., 2007. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrate. *Biotechnol. Prog.* 23, 1270-1276.
- Sagar, A.D., Kartha, S., 2007. Bioenergy and sustainable development? *Annu. Rev. Env. Resour.* 32, 131-167.

- Sanchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 185–194.
- Sengupta, D., Pike, R., 2013. *Chemicals from Biomass: Integrating Bioprocesses into Chemical Production Complexes for Sustainable Development*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Service, R.F., 2010. Is there a road ahead for cellulosic ethanol? *Science* Available at: www.sciencemag.org 329, 784–785.
- Shaklin, T., Roper, K., Yegneswaran, P., Marten, M., 2001. Selection of bioprocess simulation software for industrial applications. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 483–489.
- Sharifzadeh Baei, M., Mahmoudi, M. and Yunesi, H., 2008. A kinetic model of citric acid production from apple pomace by *Aspergillus niger*. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 3487–3489.
- Sobočan, G., Glavič, P., 2000. Optimization of ethanol fermentation process design. *Appl. Therm. Eng.* 20, 529–543.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Medeiros, A.B., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., et al., 2010. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* 101 (13), 4820–4825.
- Solomon, B.D., 2010. Biofuels and sustainability. *Annals of the New York Academy of sciences issue: ecological economics reviews Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1185, 119–134.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A., Nielsen, J., 1998. *Metabolic engineering: Principles and applications*. Academic Press, London.
- Storhas, W., 2003. *Bioverfahrensentwicklung*. Wiley-VCH. Weinheim.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744–4753.
- Teeri, T.T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T.A., 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochem. Soc. Transact.* 26, 173–8.
- Towler, G., Sinnott, R., 2013. *Chemical Engineering Design: Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design, Second Edition*. Elsevier. Oxford.
- U.S. Department of Energy, 2008. Trend of total FFVs in use from 1998–2008, based on FFV production rates and life expectancy. Available from the Alternative Fuels & Advanced Vehicles Data Center. <http://www.afdc.energy.gov/afdc/data/vehicles.html> (accessed February 6, 2009).
- Udop, 2009. Unia ~o dos Produtores de Bioenergia. <http://www.udop.com.br/index.php?item¼alcohol>.
- United Nations Conference on Trade and Development, 2006. *Challenges and Opportunities for Developing Countries in Producing Biofuels*. UNCTAD publication, UNCTAD/DITC/COM/2006/15, Geneva, November 27.
- Van der Poel, P.W., Schiweck, H., Schwartz, T., 1998. *Sugar Technology* Verlag Dr. Bartens KG, Berlin.
- Van Ginkel, S., Sung, S. and Lay, J.J., 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35(24), 4726–4730.
- Vučurović, D., Dodić, S., Popov, S., 2012. *Projektovanje bioprocasa – zbirka zadataka*. Tehnološki fakultet Novi Sad. Univerzitet u Novom Sadu.
- Wachenheim, D.E., Patterson, J.A., Ladisch, M.R., 2003. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Biores. Technol.* 86, 157–164.
- Yang, S.T., 2007. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications*. Elsevier. Amsterdam.
- Zhang, Y.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824.

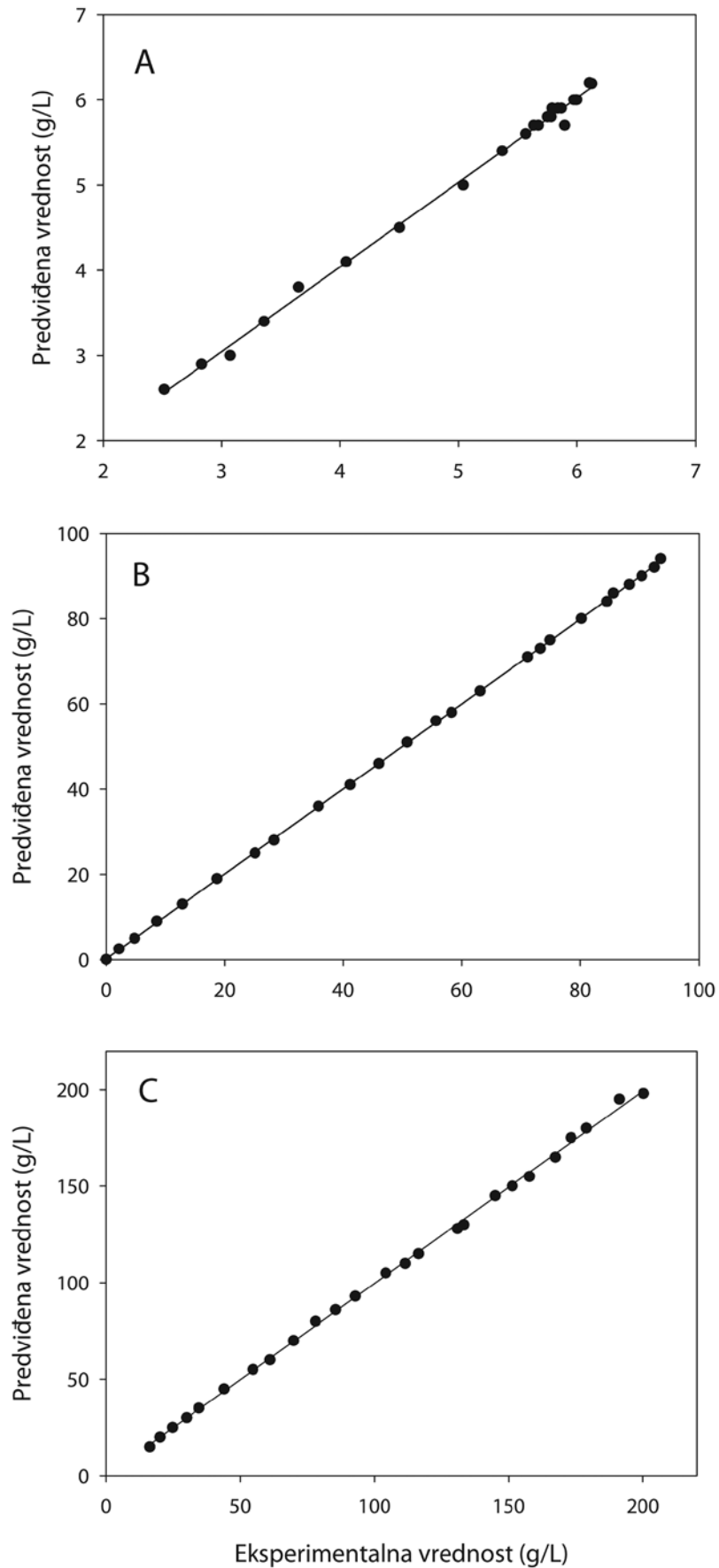
8. PRILOZI



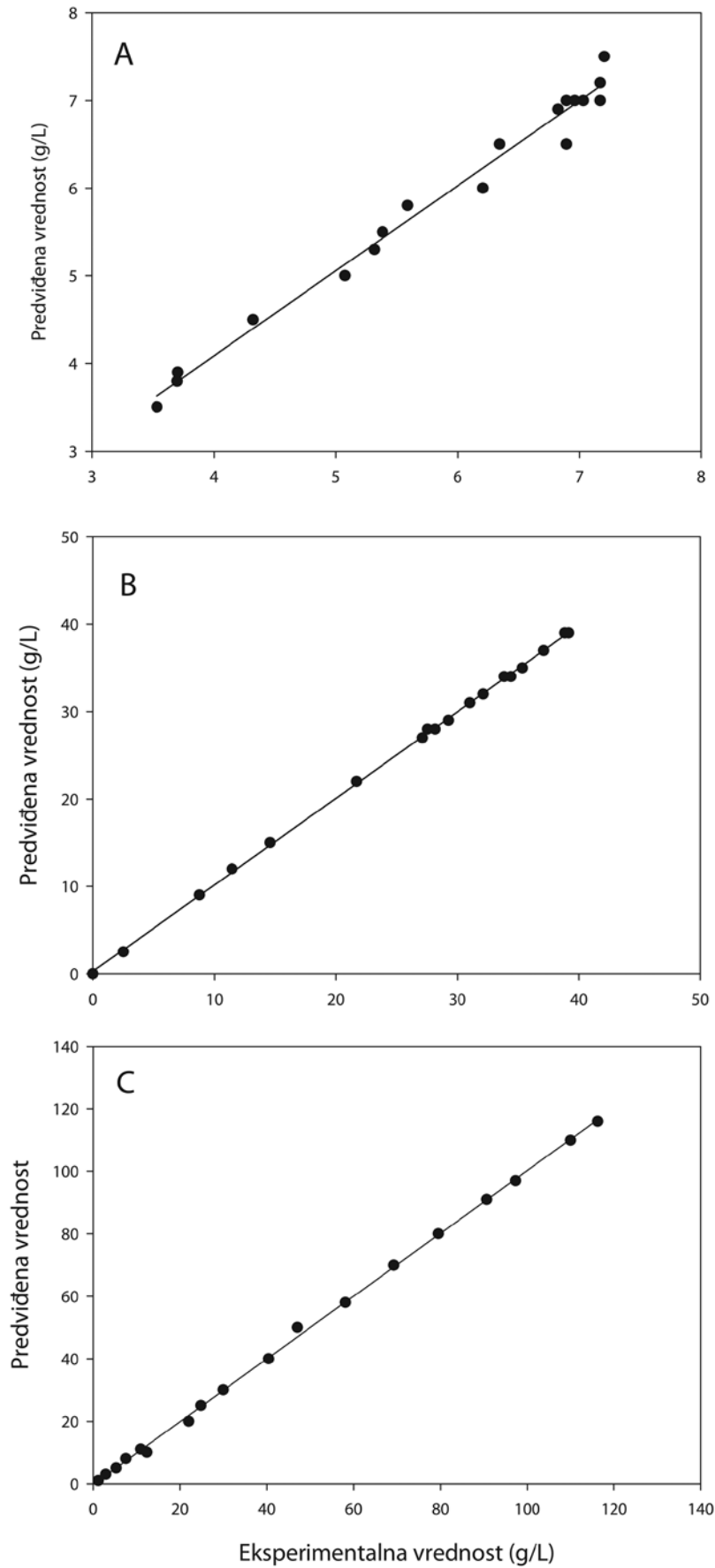
Slika 8.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije ekstrakcionog soka



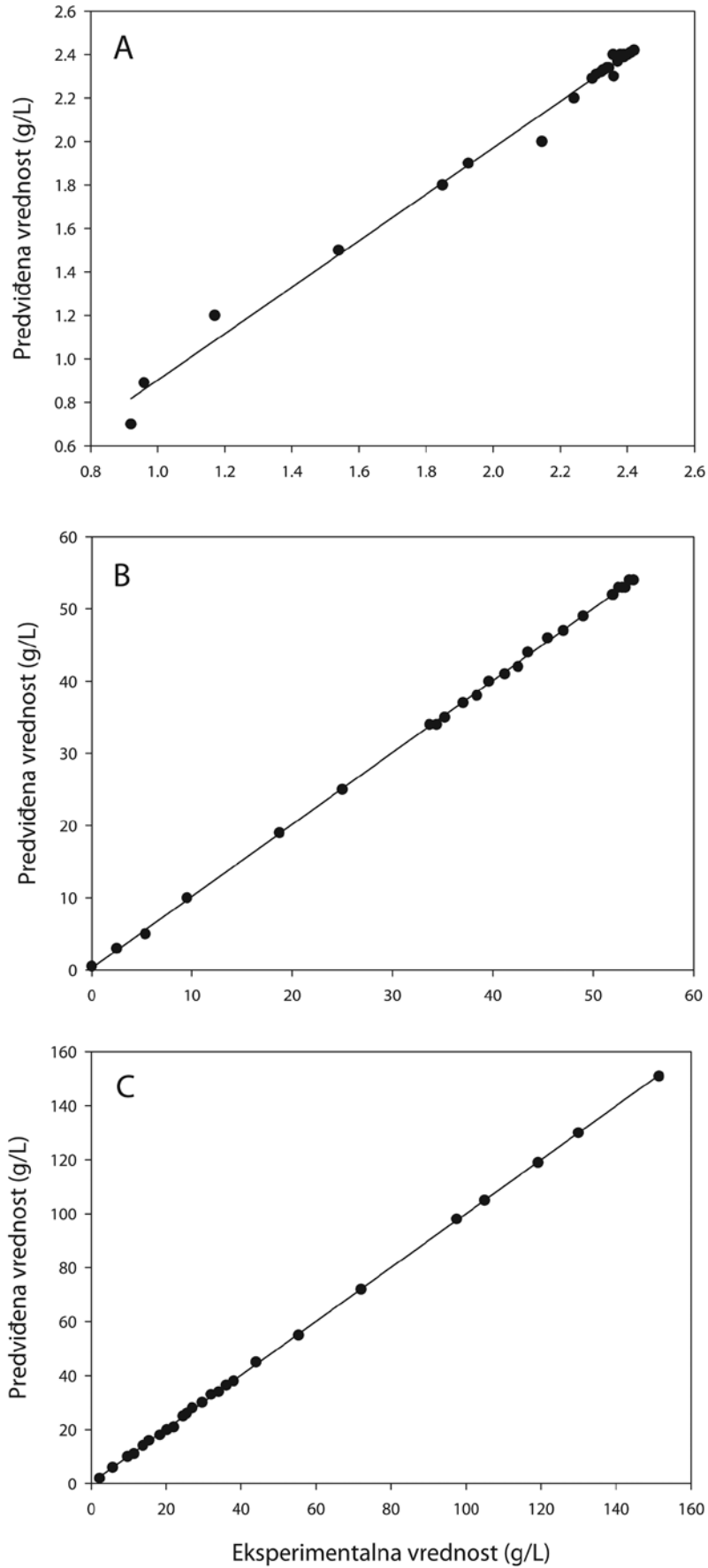
Slika 8.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (C), etanola (B) i supstrata (A) tokom fermentacije retkog soka



Slika 8.3. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije gustog soka



Slika 8.4. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije melase



Slika 8.5. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti koncentracije biomase (A), etanola (B) i supstrata (C) tokom fermentacije izluženih repinih rezanaca

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA
INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Damjan G. Vučurović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Siniša Dodić, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	Model bioprocesa proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 8; stranica 111; tabela 14; slika 59; jednačina 21; literaturnih navoda 116
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Biotehnologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Modelovanje, simulacija, etanol, lignoceluloza, izluženi repini rezanci
UDK	66.011:661.722:633.63(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija
Važna napomena: VN	nema

<p>Izvod: IZ</p>	<p>Istraživanja iz okvira ove doktorske disertacije obuhvatila su optimizaciju, kinetičko modelovanje i simulaciju dobijanja etanola fermentacijom izluženih repinih reznaca ili ekstrakcionog, retkog i gustog soka primenom metode odzivne površine, različitih kinetičkih modela i programa SuperPro Designer, redosledom.</p> <p>Optimizacijom bioprocesa doprineto je razumevanju različitih operativnih uslova, kao i međusobnih interakcija ispitanih varijabli na predtretman, hidrolizu i fermentaciju date biomase. Izvođenjem procesa pod optimalnim uslovima definisana je kinetika proizvodnog procesa, a dobijeni kinetički modeli su omogućili projektovanje čitavog bioprocesa kroz simulaciju. Krajnji model bioprocesa može olakšati definisanje materijalnih i energetskih bilansa, dimenzionisanje opreme, pravljenje plana proizvodnje, analizu produktivnosti i uklanjanje „uskih grla“, analizu troškova, ekonomske isplativosti i kapaciteta proizvodnje, sprečavanje zagađenja i njenu kontrolu, itd.</p> <p>Na osnovu toga se mogu dobiti konkretni podaci koji olakšavaju donošenje odluka o ulaganju, odnosno realizaciji projekta datog bioprocesa.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>08.07.2014. godine</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO</p>	<p>predsednik: dr Jovana Grahovac, docent, Biotehnologija, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Siniša Dodić, red. prof., Biotehnologija, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Miodrag Lazić, red. prof., Prehrambena tehnologija i biotehnologija, Tehnološki fakultet u Leskovcu</p>

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Damjan G. Vučurović
Mentor: MN	Siniša Dodić, full professor, Faculty of Technology Novi Sad
Title: TI	Bioprocess model of ethanol production from sugar beet processing intermediates and byproducts
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	Chapters 8; pages 111; tables 14; figures 59; equations 21; refernces 116
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Biotehnology
Subject, Key words SKW	Modeling, simulation, ethanol, spent sugar beet pulp
UC	66.011:661.722:633.63(043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia
Note: N	none

<p>Abstract: AB</p>	<p>Research from this framework of this study included optimization, kinetic modeling and simulation of obtaining ethanol by fermentation of spent sugar beet pulp or raw, thin and thick juice by using RSM (Response Surface Methodology), different kinetic equations and software SuperPro Designer, respectively.</p> <p>Bioprocess optimization contributed to better understanding of different operating conditions, as well as the interactions of examined parameters on pretreatment, hydrolysis and fermentation of lignocellulosic feedstock. Running the process under optimal conditions made it possible to define the kinetics of the production process, and the obtained kinetic models were used to design the entire process through simulations. The obtained final model of the bioprocess can facilitate defining the material and energy balances, equipment sizing, production planning, productivity analysis, debottlenecking, cost analysis, economic feasibility and production capacity, pollution prevention and control, etc. Based on that, concrete data could be obtained which facilitate decision making about investing, i.e. this bioprocess project realisation.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>8th July 2014</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: PhD Jovana Grahovac, Assistant Professor, Biotechnology, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: PhD Siniša Dodić, Full Professor, Biotechnology, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>member: PhD Miodrag Lazić, Full Professor, Food technology and biotechnology, Faculty of Technology in Leskovac</p>