

DOKTORSKA DISERTACIJA

Alkoholna fermentacija melase i gustog soka šećerne repe pomoću imobilisanih ćelija *Saccharomyces cerevisiae*

Mentor:

Prof. dr Radojka N. Razmovski

Kandidat:

Mr Vesna M. Vučurović

Novi Sad, 2012. godine

Uz dužno poštovanje najtoplije se zahvaljujem mentoru ovog rada prof. dr Radojki Razmovski na dragocenim savetima i pomoći prilikom postavljanja problema ike i diskusije ovog rada, kao i na bezrezervnoj podršci koju mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Ljiljani Mojović i prof. dr Siniši Markov na izuzetnoj časti koju su mi ukazali svojim učešćem u komisiji, kao i na korisnim sugestijama i dobronamernim savetima. Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Siniši Markov za pomoć prilikom pripreme proizvodnog mikroorganizma za proces fermentacije.

Rezultati ovog rada su deo projekta TR-31002 iz oblasti tehnološkog razvoja pod nazivom "Unapređenje proizvodnje bioetanola iz proizvoda procesa prerade šećerne repe", koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a čiji je nosioc prof. dr Stevan Popov.

Srdačno se zahvaljujem tehničkom saradniku Otiliji Milanović na zalaganju i pomoći u eksperimentalnom radu kao i na optimizmu sa kojim je dočekala svaki rezultat.

Hvala kolegama i prijateljima na savetima i podršci.

Beskrajno hvala mojim roditeljima na radosti i ponosu sa kojim pozdravljaju svaki moj uspeh, na podršci, pomoći i bezgraničnoj ljubavi koju mi pružaju.

Mom suprugu Milanu hvala za sigurnu luku ispunjenu ljubavlju, razumevanjem i podrškom.

Od srca hvala mojim sinovima Vuku i Aleksi za ljubav i osmehe kojima ispunjavaju svaki moj dan.

Mojim sinovima Vuku i Aleksi

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. TEORIJSKI DEO	6
2.1. Proizvodnja etanola stanje i perspektive.....	6
2.2. Sirovine za proizvodnju etanola.....	7
2.2.1. Među- i nus-proizvodi procesa prerade šećerne repe	8
2.2.2. Gusti sok šećerne repe	11
2.2.3. Melasa šećerne repe	11
2.2.4. Melasa šećerne repe nakon osmotske dehidratacije voća i povrća	15
2.3. Alkoholna fermentacija pomoću ćelija <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.4. Imobilisane ćelije <i>S. cerevisiae</i>	26
2.4.1. Metode imobilizacije ćelija kvasca.....	27
2.4.1.1. Adsorpcija na nerastvornim nosačima	28
2.4.1.2. Umrežavanje u poroznom matriksu polimera.....	30
2.4.1.3. Zadržavanje iza mikroporoznih barijera	31
2.4.1.4. Flokulacija kvasca.....	31
2.4.2. Uticaj imobilizacije na fiziologiju i metabolizam ćelija kvasca	33
2.4.3. Fermentacioni sistemi	35
2.4.4. Konfiguracije bioreaktora sa imobilisanim kvascem.....	37
2.4.5. Prednosti primene imobilisanih ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji ...	39
2.5. Biljni materijali kao nosači za imobilizaciju ćelija kvasca	41
2.5.1. Rezanci šećerne repe (RŠR), struktura i hemijski sastav.....	44
2.5.2. Parenhimsko tkivo stabla kukuruza (PTSK), struktura i hemijski sastav ...	49
2.6. Ca-alginat kao nosač za imobilizaciju ćelija kvasca.....	50
2.6.1. Struktura i hemijski sastav Ca-alginata.....	50
2.6.2. Postupci imobilizacije ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata	52
2.6.3. Karakteristike alginatnih kuglica	54
2.6.4. Fermentacija pomoću ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata	56
3. MATERIJAL I METODI	58
3.1. Materijal.....	58
3.1.1. Podloge za fermentaciju.....	58
3.1.2. Proizvodni mikroorganizam.....	59
3.1.3. Nosači za imobilizaciju proizvodnog mikroorganizma	59
3.1.3.1. Presovani rezanci šećerne repe (PRŠR), suvi rezanci šećerne repe (SRŠR) i parenhimsko tkivo stabla kukuruza (PTSK)	59
3.1.3.1. Ca-alginat.....	60
3.2. Metodi rada	60
3.2.1. Analiza PRŠR, SRŠR i PTSK.....	60
3.2.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike	60
3.2.1.2. Imobilizacioni potencijal nosača i parametri imobilizacije kvasca	61
3.2.1.3. Adsorpcione karakteristike	62
3.2.2. Priprema imobilisanog biokatalizatora za fermentaciju	65
3.2.2.1. Imobilizacija kvasca na SRŠR i PTSK	65
3.2.2.2. Imobilizacija kvasca kombinovanjem adsorpcije na diskovima PTSK i umrežavanja u Ca-alginatu.....	65

3.2.2.3. Imobilizacija kvasca u kuglicama Ca-alginata i u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK	67
3.2.3. Fermentacija.....	68
3.2.3.1. Diskontinualna fermentacija	68
3.2.3.2. Kontinualna fermentacija.....	68
3.2.4. Analitičke metode	69
3.2.5. Parametri fermentacije.....	70
3.2.6. Optička i elektronska mikroskopija	71
3.2.7. Statistička obrada rezultata	71
4. REZULTATI I DISKUSIJA	72
4.1. Analiza PRŠR, SRŠR i PTSK kao nosača za imobilizaciju kvasca	72
4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK.....	72
4.1.2. Vodeni i alkoholni ekstrakti PRŠR, SRŠR i PTSK	75
4.1.3. Imobilizacioni potencijal PRŠR, SRŠR i PTSK	78
4.1.4. Adsorpcione karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK.....	81
4.1.5. Elektronska (SEM) i optička mikroskopija.....	86
4.2. Alkoholna fermentacija melase i gustog soka pomoću imobilisanih ćelija kvasca	89
4.2.1. Analiza melase i gustog soka šećerne repe	89
4.2.2. Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR	91
4.2.3. Uticaj dodatka PTSK različitih hibrida na fermentaciju melase i gustog soka pomoću slobodnih ćelija kvasca	101
4.2.4. Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe primenom imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska.....	104
4.2.5. Fermentacija gustog soka šećerne repe primenom imobilisanih ćelija kvasca u kombinovanim diskovima od PTSK i Ca-alginata	114
4.2.6. Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata	118
4.2.7. Fermentacija melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata	131
4.2.8. Fermentacija melase primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK	139
4.2.9. Višestepena diskontinualna fermentacija gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK.....	152
4.2.10. Kontinualna VHG fermentacija gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK	157
6. ZAKLJUČAK	164
7. LITERATURA.....	169

1. UVOD

Proizvodnja etanola je stara skoro koliko i ljudska civilizacija, a alkohol je proizvod koji je za čovečanstvo kroz istoriju imao različite funkcije. Alkohol se upotrebljavao kao izvor potrebnih hranljivih materija, a zahvaljujući antiseptičkom i analgetičkom svojstvu naširoko se koristio u medicini. Premda nije sa sigurnošću utvrđeno kada je alkohol prvi put bio dobijen, arheološki pronalasci sugerišu da namensko korišćenje fermentisanih pića datira najmanje od neolita (ca. 10.000 p.n.e) (Boross i sar., 2008). U prvo vreme etanol se dobijao kao proizvod spontane fermentacije šećera i koristio se u sirovom stanju. Mnogo kasnije čovek je naučio da kontroliše fermentaciju. Sa unapređenjem postupka destilacije u periodu između 12. i 14. veka otpočela je proizvodnja čistog etanola.

Danas se u svetu oko 95% proizvedenog etanola dobija postupkom fermentacije iz obnovljivih sirovina biološkog porekla tzv. biomase, a 5% se dobija hemijskim putem ili iz nafte. Etanol dobijen alkoholnom fermentacijom iz sirovina biološkog porekla pomoću slobodno suspendovanih ili u novije vreme pomoću imobilisanih ćelija *Saccharomyces cerevisiae* se primenjuje kao rastvarač ili polazna sirovina u hemijskoj, prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji. Takođe, pod nazivom bioetanol, etanol predstavlja moderan vid obnovljive energije i može se primeniti kao aditiv ili zamena fosilnim gorivima. U Evropi se najviše etanola proizvodi fermentacijom iz šećernih ili škrobnih sirovina. Pojava viška konzumnog šećera na svetskom tržištu, povećanje prinosa i efikasnosti tehnološkog postupaka njegove proizvodnje, kao i činjenica da je njegova proizvodnja iz šećerne trske jeftinija prouzrokovali su smanjenje potražnje za šećernom repom i pojavu viška ove poljoprivredne kulture. Iz navedenih razloga pojavila se potreba da postojeće fabrike šećera usmere deo svojih među- i nusproizvoda u proizvodnju etanola, ili se u potpunosti preorijentišu na proizvodnju etanola. Melasa šećerne repe, koja nastaje kao nusproizvod procesa prerade šećerne repe, se u našem regionu tradicionalno koristi kao sirovina za proizvodnju etanola. Melasa je hipertonični rastvor šećera zahvaljujući čemu se u novije vreme koristi za osmotsku dehidraciju voća i povrća, nakon čega se takođe može upotrebiti kao sirovina za proizvodnju etanola. Pored melase, za proizvodnju etanola fermentacijom se mogu koristiti međuproizvodi procesa prerade šećerne repe kao što su ekstraktioni, retki i gusti sok. Uvođenje proizvodnje etanola u postojeće fabrike šećera predstavlja atraktivnu mogućnost za povećanje profitabilnosti proizvodnje i uštedu energije jer omogućava prilagođavanje količine proizvedenog šećera i etanola uslovima koji vladaju na tržištu što za posledicu ima stabilizaciju cena ovih proizvoda. Primena kombinovane proizvodnje konzumnog šećera i etanola u zemljama sa razvijenom proizvodnjom šećerne repe i šećera, kao što je Srbija, može imati pozitivan efekat na socio-ekonomski razvoj i regionalnu ekonomiju.

Alkoholna fermentacija podloga sa visokim sadržajem šećera (engl. VHG-Very High Gravity) je jedan od načina da se ostvari visoka produktivnost procesa proizvodnje etanola kao primarnog metabolita kvasca. VHG fermentacijom se postižu više koncentracije etanola u fermentisanoj podlozi, nego u uslovima standardne koncentracije šećera (engl. NG- Normal gravity), što omogućava značajne uštede energije u postupku izdvajanja etanola destilacijom. VHG fermentacija podrazumeva pripremu i fermentaciju podloga koje sadrže više od 250 g/l šećera. Melasa i gusti sok šećerne repe su visoko koncentrovani

rastvori saharoze koji se mogu dugo i bezbedno skladištiti i mogu se upotrebiti za pripremu podloga za VHG fermentaciju. Nasuprot tome, usled niskog sadržaja šećera ekstrakcioni i retki sok šećerne repe se ne mogu koristiti kao sirovine za VHG fermentaciju. Osim toga, relativno niska koncentracija šećera u ekstrakcionom i retkom soku šećerne repe doprinosi razvoju različitih štetnih mikroorganizama tokom skladištenja čiji metaboliti imaju inhibitorno dejstvo na metabolizam kvasca. Uzimajući u obzir ove nedostatke, ekstrakcioni i retki sok nisu bili predmet istraživanja ovog rada.

Proizvodnja etanola alkoholnom fermentacijom se još uvek u svetu, u najvećoj meri, izvodi primenom slobodno suspendovanih ćelija kvasca iz roda *S. cerevisiae* kao biokatalizatora. U cilju boljeg iskorišćenja sirovina i bolje efikasnosti procesa fermentacije u proizvodnji etanola značajnu ulogu ima primena biokatalizatora na čvrstim fazama tzv. imobilisanih ćelijskih sistema. Imobilizacijom se ćelije kvasca hemijskim ili fizičkim putem pričvršćuju za površinu čvrstih nosača. Imobilisane ćelije kvasca se kao biokatalizatori mogu višestruko koristiti u diskontinualnim ili kontinualnim postupcima fermentacije pri čemu dugotrajno održavaju visoku katalitičku aktivnost. Primenom imobilisanih ćelija kvasca u proizvodnji etanola moguće je ostvariti visoku koncentraciju aktivne biomase, kao i dobar kontakt između ćelija i hranljive podloge, čime se postiže visoka produktivnost fermentora, poboljšanje stabilnosti procesa i dobijanje proizvoda ujednačenog kvaliteta. Dve najčešće korišćene i izučavane metode za imobilizaciju kvasca u alkoholnoj fermentaciji su adsorpcija na površinu različitih nerastvornih materijala i umrežavanje u matrici polimera. Izbor metode i nosača za imobilizaciju ima ključnu ulogu u ekonomičnosti i efikasnosti procesa proizvodnje etanola. Nerastvorni prirodni materijali biljnog porekla (ljuska jabuke, kora pomorandže, stablo šećerne trske, drveni opiljci i sl.) se najčešće primenjuju kao nosači za imobilizaciju ćelija kvasca adsorpcijom zahvaljujući niskoj ceni, lakoj dostupnosti, obnovljivosti, lakoj regeneraciji i dobrim imobilizacionim svojstvima. Za imobilizaciju kvasca umrežavanjem mogu se koristiti različiti polimeri (Ca-alginat, agar-agar, k-karagenan, želatin i sl.). U alkoholnoj fermentaciji se u najvećoj meri primenjuje metod imobilizacije kvasca umrežavanjem u kuglicama Ca-alginata zahvaljujući jednostavnom postupku imobilizacije u blagim uslovima kao i zahvaljujući mogućnosti umrežavanja velike količine ćelija kvasca. Međutim, osnovni nedostaci primene ovog nosača u alkoholnoj fermentaciji su: ograničeni prenos mase supstrata i produkata kroz polimer, što ima za posledicu gubitak katalitičke funkcije ćelija imobilisanih u unutrašnjosti kuglica, malu mehaničku čvrstinu i laku degradaciju kuglica gela usled izdvajanja ugljendioksida.

Iz svih gore navedenih razloga javila se potreba da se ispita mogućnost proizvodnje etanola iz melase i gustog soka šećerne repe alkoholnom fermentacijom pomoću ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na različitim nosačima. Cilj istraživanja ovog rada je da se ispita i uporedi potencijal primene različitih materijala kao nosača za imobilizaciju ćelija *S. cerevisiae*. U okviru rada kvasac je imobilisan adsorpcijom na rezancima šećerne repe (RŠR) i parenhimskom tkivu stabla kukuruza (PTSK), umrežavanjem u Ca-alginatu i novom kombinovanom metodom imobilizacije koja predstavlja kombinaciju adsorpcije na PTSK i umrežavanja u Ca-alginatu. Rezanci šećerne repe i parenhimsko tkivo stabla kukuruza su veoma jeftini, lako dostupni, obnovljivi, visokoporozni, celulozni biljni materijali zahvaljujući čemu ispunjavaju sve predušlove da budu nosači za imobilizaciju

ćelija kvasca. Alkoholna fermentacija primenom ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na rezancima šećerne repe i parenhimskom tkivu stabla kukuruza do sada nije bila predmet istraživanja u literaturi, pa samim tim rezultati ovog rada predstavljaju novinu u tehnologiji etanola. Takođe, kombinovanje metode adsorpcije na PTSK i umrežavanja u kuglicama Ca-alginata predstavlja novi pristup u povećanju poroznosti kuglica gela čime se doprinosi povećanju biokatalitičke sposobnosti imobilisanih ćelija kvasca i povećanju efikasnosti imobilizacije ćelija kvasca na nosaču, kao i lakšem oslobađanju ugljendioksida tokom fermentacije. Detaljna analiza parametara imobilizacije kvasca na različitim nosačima, kao i poređenje postupka alkoholne fermentacije melase i gustog soka šećerne repe pomoću imobilisanih ćelija *S. cerevisiae*, pruža neophodne podatke za procenu mogućnosti i opravdanosti primene imobilisanih biokatalizatora za proizvodnju etanola iz ovih sirovina. U cilju postizanja što veće efikasnosti proizvodnje etanola iz melase i gustog soka šećerne repe, u radu su ispitani i upoređeni uslovi fermentacije ovih sirovina primenom imobilisanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* u diskontinualnom, višestepenom diskontinualnom i u kontinualnom postupku, u NG i VHG uslovima koncentracije šećera.

Utvrđivanje kinetike fermentacije pomoću imobilisanih ćelija kvasca u diskontinualnom, višestepenom diskontinualnom i kontinualnom postupku doprineće efikasnom izboru sirovine, imobilisanog biokatalizatora i procesnih uslova proizvodnje etanola.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Proizvodnja etanola stanje i perspektive

Proizvodnja etanola danas podrazumeva savremenu tehnologiju dimamičnog razvoja, obzirom na veliku upotrebnu vrednost i široku zastupljenost njenih primarnih i sekundarnih proizvoda. Danas se u svetu oko 95% proizvedenog etanola dobija iz biomase postupkom fermentacije, a oko 5% hemijskim putem iz nafte (Berg, 2004). Etanol se primenjuje u prehrambenoj, farmaceutskoj, petrohemijskoj industriji i u drugim industrijskim granama gde se upotrebljava kao rastvarač, aditiv ili polazna sirovina za različite tehnološke procese (Sivakumar i sar., 2010).

Ograničene količine i neminovni porast cene fosilnih goriva dovele su do sve veće potrebe za primenom obnovljivih, održivih i jeftinih alternativnih izvora energije, čija je primena ekološki opravdana (Najafpour i sar., 2004). U periodu od 2005. do 2030. godine u Evropi se očekuje godišnji rast proizvodnje tečnih biogoriva od oko 6,3% (Wu i sar., 2010; Coppola i sar., 2009). U novije vreme se etanol dobijen alkoholnom fermentacijom često naziva bioetanol i predstavlja najperspektivnije obnovljivo biogorivo (Sivakumar i sar., 2010). Bioetanol je obnovljiv, netoksičan, biodegradibilan izvor energije čija primena umesto fosilnih goriva ima za posledicu smanjenje emisije gasova staklene bašte i opravdano zauzima vodeću poziciju na listi biogoriva budućnosti (Balat i Balat, 2009). Etanol se može koristiti kao supstituent ili dodatak fosilnim gorivima ili kao antidetonator u obliku ETBE-a (etilercijalnog butiletra) umesto sintetičkih pojačivača oktanskog broja (Hansen i sar., 2005). Primena etanola ili ETBE-a utiče na sastav izduvnih gasova motora, smanjenjem azotnih oksida (NO_x), ugljenmonoksida (CO) i ugljovodonika. Istraživanja su pokazala da se emisije ugljovodonika mogu smanjiti za 66% korišćenjem goriva sa visokim sadržajem etanola. Ugljovodonici čine 80% ukupnih izduvnih gasova iz vozila. Takođe se, usled visokog sadržaja kiseonika u etanolu, umanjuje izdvajanje CO, koji nastaje usled nepotpunog sagorevanja ugljovodonika iz goriva (Mijović, 2005). Primenom etanola kao biogoriva moguće je zameniti 10-20% od ukupne potrošnje benzina u svetu do 2030. godine. Ovo bi zahtevalo sedmostuko povećanje kapaciteta proizvodnje etanola u odnosu na kapacitete 2005. godine (Walter i sar., 2008). Danas je u svetu proizvodnja etanola na godišnjem nivou oko 50 miliona m^3 i u stalnom je porastu. Predviđa se da će do 2025. godine u svetu godišnja proizvodnja etanola dostići 120 miliona m^3 (Nikolić i sar., 2009).

Prema direktivi Evropske Unije o korišćenju biogoriva 2003/30/EC iz novembra 2001. godine, sve zemlje članice bi trebalo da do 2010. godine zamene 5,75% fosilnih goriva gorivima iz obnovljivih sirovina, a 2020. godine čak 20%, što podrazumeva povećanje primene bioetanola kao zamene za fosilna goriva sa 0,11 Mtoe (miliona tona ekvivalenta nafte) za 2010. na 0,62 Mtoe za 2020. godinu (Foteinis i sar., 2011). Potrebe za etanolom u Srbiji neminovno rastu pa sa ozbiljnošću treba pristupiti povećanju proizvodnje etanola. Ovo se može postići, efikasnijim korišćenjem postojećih kapaciteta za proizvodnju etanola, kao i izgradnjom novih. Poljoprivredni proizvodi predstavljaju osnovne sirovine za proizvodnju etanola pa je samim tim ova tehnologija oduvek usko povezana sa poljoprivredom (Roehr, 2001). Srbija kao poljoprivredno orijentisana zemlja ima sirovinski

potencijal za efikasnu proizvodnju etanola kao biogoriva. Dalji razvoj tehnologije etanola u Srbiji bi u velikoj meri mogao da doprinese efikasnom socioekonomskom razvoju lokalne ekonomije. Budući da u Vojvodini oko 1000 km² obradivog zemljišta ostaje neiskorišćeno, jasno je da ovaj region poseduje dodatni potencijal za uzgoj poljoprivrednih kultura namenjenih proizvodnji etanola (Dodić i sar., 2009).

2.2. Sirovine za proizvodnju etanola

Proizvodnja etanola sa ciljem njegove primene kao biogoriva usmerena je ka postizanju što jeftinije proizvodnje kako bi se postigla tržišna konkurentnost cene etanola sa cenom fosilnih goriva. Na krajnju cenu etanola utiču brojni činioci kao što su cena sirovine, vrsta proizvodnog mikroorganizma, primenjeni postupak alkoholne fermentacije, godišnji kapacitet proizvodnje, količina i vrsta utrošenih energenata u samom proizvodnom postupku, dodatni godišnji troškovi (porez, osiguranja, inflacija), lokacija postrojenja, mogućnost efektivnog pokretanja procesa proizvodnje, cena sporednih proizvoda i cena transporta sirovina i proizvoda (Roehr, 2001). Proces proizvodnje etanola je veoma složen, ali se načelno može podeliti u tri osnovne faze:

- priprema sirovine,
- alkoholna fermentacija i
- izdvajanje i prečišćavanje etanola.

Sve tri navedene faze proizvodnje su veoma složene i specifične.

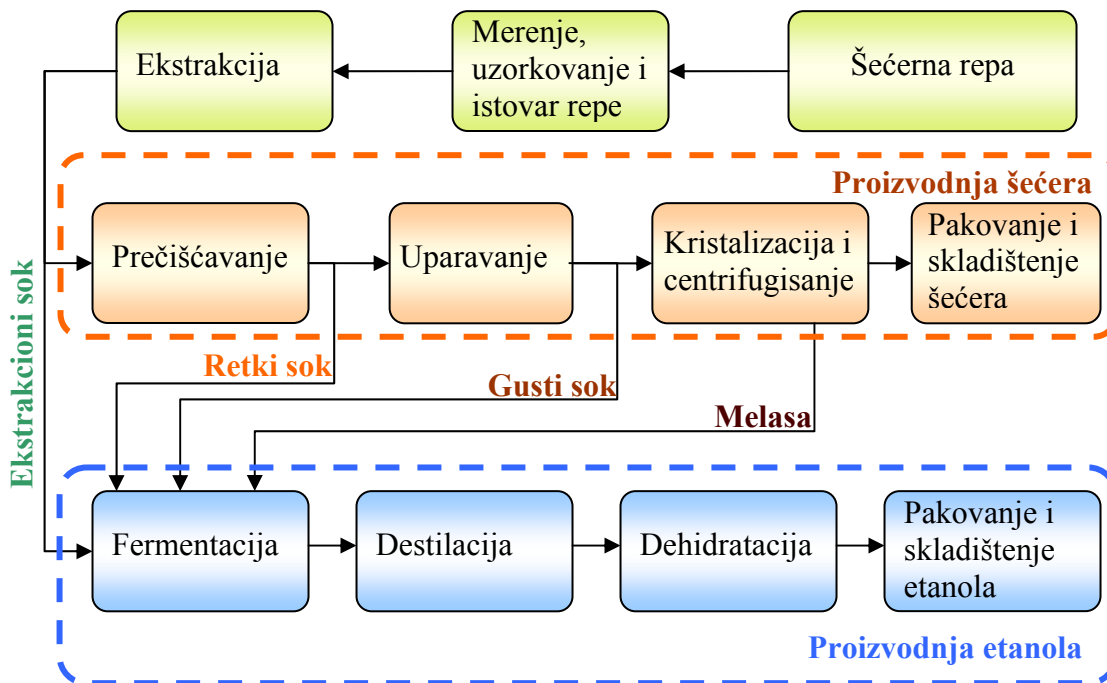
Troškovi procesa proizvodnje bioetanola u najvećoj meri zavise od primenjene sirovine (Kosarić i Vardar-Sukan, 2001). Tržišna cena sirovina koje se koriste za proizvodnju bioetanola zavisi od njihove potražnje za druge primene, od mogućnosti valorizacije sporednih proizvoda, a takođe na cenu može uticati i politika države (Lazić i sar., 2007). Kako cena sirovine čini 55-75% prodajne cene etanola, proizvodnja alkohola iz jeftinih i lako dostupnih sirovina ima ključnu ulogu u isplativosti ovog tehnološkog procesa, pri čemu treba uzeti u obzir i troškove pripreme sirovine za fermentaciju, kao i ostvareni prinos etanola (Cardona i Sanchez, 2007; Zayed 1997). Etanol se može proizvesti postupkom alkoholne fermentacije iz različitih sirovina biološkog porekla koje sadrže ugljene hidrate koje kvasac kao proizvodni mikroorganizam može da asimiluje, ili iz sirovina čiji se polisaharidi mogu razgraditi do asimilujućih oblika (Pejin i sar., 2009). Sirovine za proizvodnju etanola se mogu klasifikovati prema vrsti ugljenih hidrata na sirovine koje sadrže fermentabilne šećere (šećerna repa, melasa i sokovi šećerne repe, šećerna trska, melasa i sokovi šećerne trske, voćni plodovi, plodovi tropskih biljaka i sl.), sirovine koje sadrže skrob (kukuruz, žitarice, krompir i brojni krtolasti plodovi) i lignocelulozne sirovine (drvo, trave, komunalni otpad itd.) (Behera i sar., 2010; Hatano i sar., 2009). Kada se razmatra mogućnost industrijske proizvodnje etanola iz određenih sirovina uzimaju se u obzir sadržaj ugljenih hidrata, cena i dostupnost sirovine, kao i cena tehnološkog postupka proizvodnje etanola iz određene sirovine (Mojović i sar., 2007). Priprema skrobnih sirovina podrazumeva njihovo čišćenje, usitnjavanje, toplotni tretman i enzimsku hidrolizu primenom komercijalnih enzima ili enzima slada, što u velikoj meri poskupljuje proces. Celulozna biomasa je sirovina sa ogromnim potencijalom, jer je

najveća i svima dostupna sirovinna baza, koja će se perspektivno masovno koristiti u biotehnoškoj proizvodnji. Danas još uvek ne postoji jeftin i ekonomičan način termičko-enzimske razgradnje celuloze do fermentabilnih šećera što predstavlja veliki nedostatak primene ovih sirovina u proizvodnji etanola. Priprema šećernih sirovina za alkoholnu fermentaciju najčešće podrazumeva ekstrakciju šećera i razblaženje sirovine vodom i sterilizaciju, te je stoga jednostavna i relativno jeftina. Šećerne sirovine sadrže direktno fermentabilne šećere pa stoga, uzimajući u obzir ekonomičnost kao i potrošnju energije za pripremu sirovine, predstavljaju isplativije i pogodnije sirovine za proizvodnju etanola u poređenju sa skrobnim i lignoceluloznim sirovinama (Panagiotopoulos i sar., 2010, Rodríguez i sar., 2010). Generalno posmatrano, šećerne sirovine koje sadrže direktno fermentabilne šećere predstavljaju idealne supstrate za alkoholnu fermentaciju (Hatano i sar., 2009).

2.2.1. Među- i nus-proizvodi procesa prerade šećerne repe

U Evropi šećerna repa je najviše zastupljena sirovina za proizvodnju konzumnog šećera ali je takođe perspektivna energetska sirovina zahvaljujući tekućim izmenama u agrarnoj politici Evropske Unije (EU). Usled pojave viška šećera na svetskom tržištu u prethodnoj deceniji Evropska unija je smanjila finansiranje proizvodnje šećera na trećinu. Naime, 1999. godine obradive površine pod šećernom repom u EU-25 iznosile su 2,5 Mha (miliona hektara) i do 2005. godine su redukovane na 2,2 Mha. Zatim je 2005. godine Evropska Komisija predložila reformu sa ciljem da redukuje proizvodnju šećera na 8 Mt/a (miliona tona po aru), ostavljajući neiskorišćeno približno 0,9 Mha pod šećernom repom. Ovo će verovatno navesti proizvođače šećera u pojedinim zemljama kao što su Grčka i Italija, da minimalizuju proizvodnju šećera, dok će industrije šećera u pojedinim razvijenim zemljama, kao što su Nemačka, Francuska, Velika Britanija, Holandija verovatno opstati (Panagiotopoulos i sar., 2010). Na svetskom tržištu šećera je ponuda značajno veća u odnosu na potražnju, pa zbog toga cena ovog proizvoda izuzetno varira (Tian i sar., 2009). Navedeni tržišni uslovi naveli su proizvođače šećerne repe i šećera da deo svojih proizvodnih kapaciteta preusmere na proizvodnju etanola, koji se kao biogorivo može primeniti za nadoknadu dela utrošene energije (Krajnc i Glavič, 2009). Nasuprot padu proizvodnje šećera u EU u narednim godinama očekuje se porast komercijalne proizvodnje biogoriva iz šećerne repe (Panagiotopoulos i sar., 2010). Melasa i drugi intermedijerni proizvodi procesa prerade šećerne repe su veoma dobre sirovine za proizvodnju etanola usled visokog sadržaja fermentabilnih šećera pa se mogu primeniti u alkoholnoj fermentaciji bez prethodnih modifikacija (Rodríguez i sar., 2010). Istraživanja su potvrdila da je kombinovana proizvodnja šećera i etanola u istoj fabrici atraktivna opcija za povećanje profitabilnosti sa aspekta uštede energije, posebno ako se za proizvodnju etanola koriste nusproizvodi prerade šećerne repe (Krajnc i sar., 2007). Uvođenje proizvodnje etanola u postojeće fabrike šećera predstavlja atraktivno rešenje, jer omogućava usaglašavanje proizvedenih količina šećera i etanola sa zahtevima koji vladaju na tržištu, pa samim tim i uravnoteženje ponude sa potražnjom, što za posledicu ima stabilizaciju cena ovih proizvoda (Tian i sar., 2009). Pored toga utvrđeno je da proizvodnja etanola iz šećerne repe ima pozitivniji uticaj na životnu sredinu nego proizvodnja šećera iz iste količine ove sirovine (Foteinis i sar., 2011). Primena ove kombinovane tehnologije u zemljama sa razvijenom proizvodnjom šećerne repe i šećera, kao što je Srbija, imala bi pozitivan efekat

na socioekonomski razvoj i regionalnu ekonomiju. Kombinovana proizvodnja šećera i/ili etanola obuhvata procese i operacije tehnologije šećera i tehnologije etanola (Krajnc i Glavič, 2009). Blok šema kombinovane proizvodnje šećera i/ili etanola je prikazana na slici 2.1.



Slika 2.1. Blok šema proizvodnje etanola i/ili šećera (Krajnc i Glavič, 2009).

Tehnološki postupak proizvodnje šećera je najčešće kontinualan i odvija se po sledećim osnovnim fazama procesa koje su međusobno povezane: priprema šećerne repe za ekstrakciju, ekstrakcija šećera iz izrezanih reznaca šećerne repe, čišćenje soka, koncentrisanje (uparavanje) soka, kristalizacija saharoze i dorada kristala. Pored osnovnog tehnološkog procesa, tehnologija šećera obuhvata i pomoćne procese i operacije u pogonima za proizvodnju energije, pomoćnih materijala i doradu nusproizvoda (Šušić i sar., 1994).

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.) je vrlo rasprostranjena biljka, prilagodljiva širokom opsegu različitih zemljišnih i klimatskih uslova. U tehnološkom pogledu najveći značaj ima koren šećerne repe, jer je u njemu sadržan najveći deo šećera, saharoze. Vrat korena se takođe upotrebljava za proizvodnju šećera, dok su glava i rep siromašni šećerom i ne upotrebljavaju se za proizvodnju šećera, već se odsecaju i koriste za stočnu ishranu. Sadržaj saharoze, kao osnovne komponente za proizvodnju šećera je u proseku 17,5% (m/m). U tehnološkom postupku proizvodnje šećera šećerna repa se pere, reže, a zatim se iz izrezanih slatkih reznaca ekstrahuje šećer toplom vodom temperature 70-75 °C, pri vrednosti pH 5-6, kako bi se dobio sirovi ekstrakcioni sok. Nakon ekstrakcije, kao nusproizvod, preostaju rezanci šećerne repe koji se nakon presovanja i sušenja najčešće prodaju kao stočna hrana. Ekstrakcioni sok sadrži oko 15-20% suve mase sa sadržajem šećera 85-90%, odnosno nešećera 10-15%, računato na suhu masu (Hinková i Bubník,

2001). Pored rastvorenih komponenti, ekstrakcioni sok sadrži do 1% grubo suspendovanih nerastvorenih nečistoća kao što su delovi rezanaca nerastvorni delovi humusa i peska (Šušić i sar., 1994). Ekstrakcioni sok se zatim prečišćava dodatkom krečnog mleka u količini od 0,2-0,3% CaO računato na sok, uz povremeno uvođenje CO₂ pri čemu se obrazuju čestice saturacionog mulja (istaloženi nešećeri, teško rastvorne soli kalcijuma, koagulati koloida, adsorbovani nešećeri na CaCO₃ česticama). Taloženjem i filtracijom iz soka se izdvaja saturacioni mulj i dobija se retki sok sa prosečnim sadržajem šećera 10-15%, koji se može dodatno prečistiti postupcima sulfiteacije, adsorpcije ili jonske izmene. Prečišćeni retki sok se zatim u višestepenom postupku uparavanja koncentriše do gustog soka sa prosečnim sadržajem šećera od 67% iz kojeg se u višefaznom procesu kristalizacije izdvaja šećer. Iz 100 kg šećerne repe dobija se prosečno oko 130 kg retkog soka iz kojeg se uparavanjem vode dobija oko 30 kg gustog soka, što znači da otpari oko 100 kg vode na 100 kg šećerne repe. Para koja nastaje uparavanjem soka u pojedinim fazama naziva se sekundarna para i koristi se za zagrevanje svih međufaznih produkata i održavanje toplotnog režima u procesu. U toku uparavanja ne dolazi do značajnih izmena u hemijskom sastavu soka. Eventualne promene se mogu manifestovati u vidu porasta sadržaja bojjenih materija, redukujućih šećera i alkaliteta soka. Proces kristalizacije podrazumeva ukuvavanje gustog soka u vakuum aparatima na oko 80 °C do sadržaja suve mase oko 80% kada se postigne stanje presičenosti rastvora saharoze koje je neophodno za formiranje i rast kristala. Nusproizvod poslednje faze kristalizacije je sirup iz kog se u normalnim uslovima kristalizacije više ne može dobiti šećer i naziva se melasa (Šušić i sar., 1994).

Proces proizvodnje etanola iz među proizvoda (ekstrakcioni, retki i gusti sok) i nusproizvoda (melasa) prerade šećerne repe (Slika 2.1.) podrazumeva pripremu podloga za fermentaciju razblaživanjem sirovine, podešavanje pH i sterilizaciju podloge, fermentaciju, izdvajanje etanola destilacijom, dehidrataciju etanola, kontrolu kvaliteta i pakovanje etanola kao finalnog proizvoda (Krajnc i Glavič, 2009). Ekstrakcioni, retki i gusti sok kao međuproizvodi procesa prerade šećerne repe i melasa kao nusproizvod prerade šećerne repe predstavljaju dobre sirovine za proizvodnju etanola primenom slobodnih ćelija kvasca. Prilikom pripreme podloga za alkoholnu fermentaciju u standardnim uslovima koncentracije šećera (NG), za razblaženje melase i gustog soka potrebna je značajno veća količina vode nego za ekstrakcioni i retki sok. Nedostatak primene ekstrakcionog soka sa aspekta vođenja procesa fermentacije je visok sadržaj saponina, koji izazivaju penjenje tokom fermentacije što iziskuje doziranje antipenušavca (Ranković, 2011). Relativno niska koncentracija šećera u ekstrakcionom i retkom soku šećerne repe doprinosi razvoju različitih mikroorganizama tokom skladištenja. Pojedini metaboliti ovih mikroorganizama (plesni, kvasci i bakterije), kao što su na primer, mikotoksini i pri određenim koncentracijama imaju inhibitorno dejstvo i predstavljaju faktore stresa proizvodnog kvasca (Russell, 2003). Ekstrakcioni sok sadrži do 200 g/l, a retki sok do 150 g/l šećera, pa se usled toga ne mogu koristiti kao podloge za VHG fermentaciju koja podrazumeva fermentaciju podloga sa sadržajem šećera višim od 250 g/l, što predstavlja još jedan nedostatak primene ovih sirovina sa aspekta proizvodnje etanola.

2.2.2. Gusti sok šećerne repe

Gusti sok, dobijen koncentrovanjem i ugušćenjem retkog soka, je veoma čist i visoko koncentrovan rastvor šećera, sa sadržajem suve materije od 60-65%, od čega je oko 90% saharoza, pa se može dugo i bezbedno skladištiti. U toku uparavanja retkog soka dolazi do taloženja nekih nešećera pa stoga gusti sok ima viši kvocijent čistoće, odnosno sadržaj saharoze na suhu masu. Tokom uparavanja dolazi do razgradnje ili transformacije aminokiselina u druga jedinjenja pa je sadržaj aminokiselina u gustom soku dvostruko niži nego u retkom soku. Takođe, tokom uparavanja dolazi do razlaganja amida aminokiselina, kao što su asparagin i glutamin, pri čemu se oslobađa amonijak i nastaju glutaminska, pirolidonkarbonska, asparaginska i oksalna kislina. Usled nastanka ovih kiselina dolazi do smanjenja alkalnosti soka. Tokom uparavanja se smanjuje rastvorljivost mnogih soli kalcijuma, pa dolazi do taloženja soli kalcijum karbonata i kalcijum oksalata. Uparavanje prouzrokuje razlaganje dela saharoze i smanjenje sadržaja saharoze za 0,01% izraženo na masu repe. Usled razlaganja saharoze, razlaganja redukujućih šećera i usled kondenzacije šećera sa aminokiselinama povećava se obojenost odnosno prisustvo komponenti boje u soku (Šušić i sar., 1994). Nakon kristalizacije i izdvajanja kristala kao nusproizvod procesa prerade šećerne repe preostaje melasa.

2.2.3. Melasa šećerne repe

Melasa šećerne repe je tamno mrki viskozni sirup konzistencije meda iz kog se u normalnim uslovima kristalizacije više ne može dobiti šećer. Prinos melase je oko 4% na masu repe ili oko 23% na masu dobijenog šećera. Hemijski sastav melase varira u zavisnosti od kvaliteta i dužine skladištenja šećerne repe kao i od primenjenog tehnološkog postupka i dodataka koji se koriste u proizvodnji šećera. Melasa sadrži 74-84% suve mase, odnosno 16-26% vode koja se većim delom nalazi u slobodnom obliku, a manjim delom u vezanom obliku (Šušić i sar., 1994).

Sadržaj saharoze u melasi može značajno da varira od 46 do 52%. Sa stanovišta proizvodnje kvasca i etanola sadržaj saharoze ima najveći tehnološki značaj. Osim saharoze melasa sadrži 1-2,5% drugih redukujućih materija. Invertni šećer u melasi potiče delom iz šećerne repe, a delom nastaje hidrolizom saharoze u procesu prerade šećerne repe. Sadržaj invertnog šećera u melasi iznosi do 1%. Od ugljenih hidrata melasa sadrži trisaharide rafinozu i u malim količinama kestozu i monosaharide glukozu, fruktozu, a mogu se naći i tragovi arabinoze, galaktoze i ksiloze. Melasa obično sadrži 0,5-2,0% rafinoze, ali u slučaju dugotrajnog i neadekvatnog skladištenja šećerne repe sadržaj rafinoze može da dostigne i 10% (Šušić i sar., 1994). Takođe, treba imati u vidu da ćelije kvasca *S. cerevisiae* kao izvore energije iz melase mogu u određenoj meri da koriste saharozu, glukozu, fruktozu, galaktozu i rafinozu, a ne mogu da koriste arabinozu i ksilozu (Pejin, 1989).

U proizvodnji pekarskog kvasca i etanola pored sadržaja šećera veliki značaj ima sadržaj azotnih materija u melasi. Sastav i procentualni udeo pojedinih azotnih jedinjenja u ukupnom sadržaju azotnih materija prikazan je u tabeli 2.1. Azotna jedinjenja u melasi su: betain, aminokiseline, proteini, amidi, melanoidini i male količine amonijačnih soli i

nitrata. Približno trećinu azotnih jedinjenja melase čini betain. Sadržaj betaina u melasi varira u opsegu 4-7%, dok je sadržaj ostalih azotnih jedinjenja u melasi oko 1,5%. Amikokiseline čine polovinu od ukupne količine organskih azotnih jedinjenja melase. Ukupna količina aminokiselina u melasi opada sa trajanjem kampanje usled uticaja uslova skladištenja na kvalitet šećerne repe. Empirijski je utvrđeno da između sadržaja ukupnog i asimilujućeg amino azota u melasi postoji određena zavisnost koja je prikazana u tabeli 2.2.

Tabela 2.1. Sadržaj pojedinih azotnih jedinjenja u melasi (Pejin, 1989).

Azotno jedinjenje	Sadržaj azotnog jedinjenja jedinjenja		
	% (m/m) melase	% (m/m) suve mase melase	% (m/m) azotnih jedinjenja melase
Betain i proteini	0,9339	1,252	64,8
Aminokiseline	0,4583	0,5758	30,9
Amonijačne soli	0,0383	0,0485	2,6
Amidi	0,0246	0,0313	1,6
Ukupno	1,4551	1,9076	100,0

Tabela 2.2. Odnos sadržaja ukupnog i amino azota u melasi (Pejin 1989).

Ukupan azot u melasi (% m/m)	Amino azot u melasi (% m/m)
0,7-1,0	0,1
1,1-1,3	0,2
1,4-1,6	0,3
1,7-1,9	0,4

Od azotnih jedinjenja kvasac ima sposobnost da asimiluje aminokiseline i amide kiselina (asparagin, glutamin) i samo oko 5% od ukupne količine betaina. Aminokiselinski sastav hidrolizovane melase je prikazan u tabeli 2.3. (Pejin 1989; Šušić i sar., 1994). Melasa sadrži sedamnaest različitih aminokiselina, ali je glutaminska kiselina ubedljivo najzastupljenija aminokiselina u melasi. Sadržaj azota u melasi se kreće od 1,4 do 2,1% pri čemu kvasac može da iskoristi samo 0,4-0,6% azota računato na melasu (Pejin 1989; Šušić i sar., 1994).

Melasa sadrži 0,013-0,17% nitrata koji se tokom skladištenja redukuju u nitrite dejstvom bakterija prisutnih u melasi, prvenstveno delovanjem *Bacillus mesentericus*. Nitriti pri koncentracijama iznad 0,004% štetno deluju na rast ćelija kvasca i razmnožavanje, a pri višim koncentracijama dolazi do izumiranja ćelija kvasca. (Pejin 1989).

Melasa sadrži neisparljive organske kiseline koje potiču iz repe (oksalna, ćilibarna, glutarna itd.) ili nastaju iz monosaharida u toku čišćenja soka (mlečna, glucinska, apoglucinska itd.). Mlečna kiselina je najviše zastupljena neisparljiva organska kiselina u melasi, a njen sadržaj varira od 4 do 6%. Slobodne isparljive kiseline se u melasi po pravilu nalaze u neznatnim količinama. Međutim, zakišeljavanjem melase dolazi do delimične hidrolize soli isparljivih kiselina, pri čemu se oslobađaju mravlja, sirćetna, propionska, buterna, izobuterna, valerijanska i kapronska kiselina. Veće količine isparljivih kiselina

(preko 1,2% na melasu) imaju inhibitorno dejstvo na ćelije kvasca. Buterna kiselina ima najizraženije negativno dejstvo na metabolizam kvasca. Utvrđeno je da buterna kiselina pri koncentraciji 0,005% u hranljivoj podlozi ima negativan uticaj na rast ćelija kvasca, dok pri koncentraciji 0,1% dolazi do potpune inhibicije pojedinih enzima ćelija kvasca koji učestvuju u fermentaciji. Pri koncentraciji buterne kiseline u podlozi od 0,15%, što odgovara koncentraciji 0,6% u melasi, dolazi do kompletne inhibicije enzimskog sistema i metabolizma kvasca (Pejin, 1989). Sadržaj mravlje i sirćetne kiseline u melasi varira od 0,2-0,5%, sadržaj propionske kiseline je do 0,3%, dok je sadržaj valerijanske kiseline do 0,1% na melasu (Šušić i sar., 1994). Treba imati u vidu da ćelije kvasca mogu da koriste mlečnu i sirćetnu kiselinu kao izvore energije isključivo pri aerobnim uslovima ali ne i tokom alkoholne fermentacije u anaerobnim uslovima (Pejin, 1989).

Tabela 2.3. Aminokiselinski sastav hidrolizovane melase (Šušić i sar., 1994).

Aminokiselina	(% m/m) melase
Glutaminska kiselina	4,17
Leucin-izoleucin	0,55
Asparginska kiselina	0,37
Glikol	0,30
Valin	0,30
Aminobuterna kiselina	0,30
Alanin	0,28
Tirozin	0,21
Prolin	0,11
Fenilalanin	0,09
Cistidin	0,05
Serin	0,05
Lizin	0,03
Arginin	0,03
Histidin	0,03

Pozitivno i negativno naelektrisani koloidi su u melasi vezani adsorpcionim silama za pektinske materije, šećere i gumaste materije u melasi. Koloidi melase su u najvećoj meri organske prirode (96%) pri čemu je 20-90% prisutnih koloida rastvorljivo u vodi. Koloidi melase su nosioci boje melase jer su u velikoj meri vezani za komponente boje kao što su melanoidini, karameli i gvožđe-polifenolna jedinjenja. Melanoidini su mrko-žuto obojene materije koje u procesu prerade šećerne repe nastaju reakcijom između redukujućih šećera, u najvećoj meri pentozna i aminokiselina ili peptida. Karameli (karamelan, karamelen i karamelin) su tamno-mrke boje i nastaju kao produkti termičke razgradnje saharoze, tzv. postupkom karamelizacije. Polifenolni kompleks gvožđa je žuto-zelene boje i nastaje reakcijom pirokatehina iz epiderma šećerne repe sa prisutnim katjonima. Sadržaj bojenih materija u melasi je 4-8%. Negativno naelektrisani koloidi su primarni nosioci boje melase jer su strukturno povezani sa melanoidinima i karamelom u huminske komponente. Huminske komponente melase negativno utiču na ćelijski rast i u velikoj meri otežavaju fermentaciju, pa samim tim povećanje sadržaja koloida i bojenih materija u hranljivoj

podlozi na bazi melase ima negativan uticaj na metabolizam kvasca (Pejin, 1989; Šušić i sar., 1994).

Melase šećerne repe sadrže relativno male količine SO₂ (0,01-0,05%) koji se dodaje u fazi ekstrakcije repinih rezanaca. Međutim ukoliko se u procesu prerade šećerne repe nakon čišćenja soka primenjuje naknadna sulfitacija dobijaju se melase sa povišenim sadržajem SO₂. Kada je sadržaj SO₂ u melasi viši od 0,025% usporava se rast ćelija kvasca. U cilju smanjenja količine SO₂, melasa se najčešće tretira dodatkom hlornog kreča (Pejin, 1989).

Mikroorganizmi koji se mogu naći u melasi potiču iz šećerne repe, iz uređaja i opreme u procesu prerade, ili iz vazduha. Vrste i brojnost mikroorganizama u melasi se razlikuje od slučaja do slučaja, ali se često mogu naći različiti kvasci (rodovi: *Torula*, *Micotorula*, *Mycoderma*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*), plesni (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*) i brojne vrste bakterija od kojih treba izdvojiti nekoliko rizičnih vrsta roda *Leuconostoc* (Pejin, 1989).

Melase sa visokim sadržajem SO₂, isparljivih kiselina, nitrita, bojenih materija i koloida ili melase koje imaju izražen stepen mikrobiološke infekcije, smatraju se defektnim melasama i nisu pogodne za pripremu hranljivih podloga za fermentaciju primenom ćelija *S. cerevisiae* (Pejin, 1989).

Neorganske komponente melase su uglavnom neorganske soli (karbonati, sulfati, hloridi, nitrati i fosfati) kalijuma, natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, aluminijuma i gvožđa. Sadržaj pepela u melasi je obično u opsegu 6-11% (Šušić i sar., 1994). Male količine jona kalijuma, natrijuma, magnezijuma, kalcijuma, mangana, gvožđa, cinka, bakra i hlora u fermentacionoj podlozi imaju stimulatívno dejstvo na brzinu rasta i fermentaciju. Melasa ima sposobnost puferovanja, odnosno sposobnost da održava pH bez obzira na dodatak baze ili kiseline. Supstance koje imaju sposobnost puferovanja sadržane su u neorganskom delu suve mase melase, pa se povećanjem sadržaja neorganskih materija melase, odnosno pepela, povećava puferna moć melase. Puferno dejstvo se pripisuje prisustvu katjona jakih baza (K⁺ i Na⁺) i anjona slabih organskih kiselina (mlečne, sirćetne i glutarne) kao i prisustvu aminokiselina i proteina (Pejin, 1989; Šušić i sar., 1994).

Melasa sadrži male količine vitamina čiji je prosečan sadržaj prikazan u tabeli 2.4. Vitamini u melasi potiču iz šećerne repe. Količina vitamina veoma varira, kako u zavisnosti od kvaliteta šećerne repe, tako i u zavisnosti od tehnološkog procesa gde se usled alkalnih uslova razgradi najveći deo vitamina koji su inače najpostojaniji u slabokiselnoj sredini (Šušić i sar., 1994). Pri tome treba imati u vidu da su tiamin, riboflavin, pantotenska kiselina, nikotinska kiselina, piridoksin i biotin osnovni i esencijalni faktori rasta ćelija *S. cerevisiae*, koji doprinose kako rastu tako i fermentativnoj aktivnosti ćelija kvasca (Pejin, 1985).

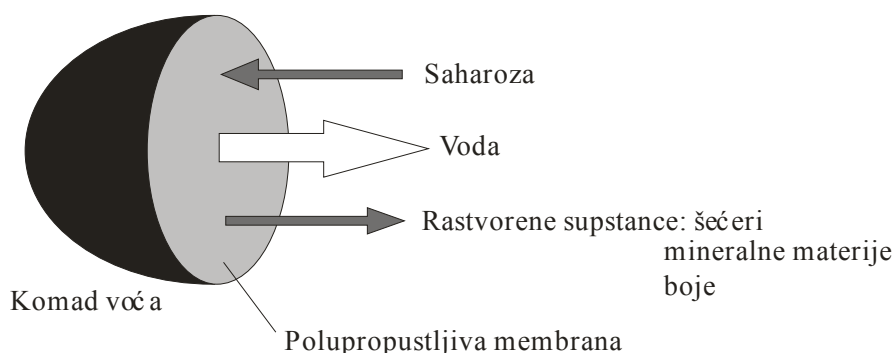
Tabela 2.4. Prosečan sadržaj vitamina u melasi šećerne repe (Šušić i sar., 1994)..

Vitamin	µg/100 g melase
Tiamin (B ₁)	130
Riboflavin (B ₂)	41
Pantotenska kiselina (B ₃)	13000
Nikotinska kiselina (B ₅)	5100
Piridoksin (B ₆)	540
Biotin (B ₇)	5
Folna kiselina	21

Iz svega izloženog može se zaključiti da je sastav gustog soka i melase šećerne repe uslovljen kvalitetom repe i primenjenom tehnologijom prerade repe, ali da melasa i gusti sok svakako predstavljaju veoma dobre i isplative sirovine za proizvodnju etanola alkoholnom fermentacijom pomoću *S. cerevisiae*.

2.2.4. Melasa šećerne repe nakon osmotske dehidracije voća i povrća

Melasa šećerne repe je hipertonični koncentrovani rastvor šećera pa se zahvaljujući tome može upotrebiti za osmotsku dehidraciju voća i povrća. Osmotska dehidracija je postupak delimične hidratacije ili koncentracije namirnica bogatih u sadržaju vode, kao što su voće i povrće u koncentrovanim vodenim rastvorima šećera ili soli kroz polupropustljivu membranu koju čine ćelije tretiranog biljnog materijala. Tokom osmotske dehidracije voća i povrća (Slika 2.2.) odvija se difuzija vode iz uzorka biljnog materijala u rastvor i difuzija sastojaka iz rastvora u biljni materijal (Erle i Schubert, 2001).

**Slika 2.2.** Razmena mase tokom osmotske dehidracije voća (Erle i Schubert, 2001).

Pogonska sila za pokretanje ovih difuzionih procesa je razlika osmotskog pritiska između biljnog tkiva i rastvora koji ga okružuje. Difuzija male količine ćelijskih sokova iz tkiva u rastvor dovodi do izvesnog gubitka hranljive vrednosti voća i obogaćivanja melase jer se iz tkiva delimično ispiraju minerali, vitamini i šećeri sadržani u ćelijskim sokovima voća i povrća (Filipčev, 2009). Brzina difuzije vode iz biljnog tkiva zavisi od više faktora kao što

su: temperatura, koncentracija osmotskog rastvora, veličina i oblik tkiva, maseni odnos rastvora i tkiva i brojni drugi faktori (Rastogi i sar., 2002).

Osmotska dehidracija kao predtretman ima prednost nad uobičajenim postupcima sušenja, jer ne dolazi do promena u nutritivnim i funkcionalnim osobinama hrane, kao ni u njenom izgledu (boja, tekstura, itd.). Smanjenje sadržaja vlage odvija se bez promene agregatnog stanja vode tako da je mnogo povoljnija i sa aspekta uštede u energiji (Rosa i sar., 2001). Međutim, osnovni problem je upotreba velikih količina hiperotiničnih rastvora, pa su istraživanja usmerena u dva pravca. Prvi pravac je višestruko korišćenje hipertoničnog rastvora, uz naknadnu korekciju njegove suve materije, a drugi valorizacija korišćenog osmotskog rastvora kao nusproizvoda u drugim industrijskim granama (Rastogi i sar., 2002). Za osmotsku dehidraciju jabuke, kupusa kao i drugog voća i povrća, za sada se pretežno kao hipertonični rastvori koriste različiti šećeri i natrijum hlorid (Djelveh i sar., 2001). Novija istraživanja pokazuju da se u ove svrhe vrlo uspešno može upotrebiti i melasa šećerne repe (Filipčev i sar., 2006; Filipčev i sar., 2008; Lević i sar., 2008).

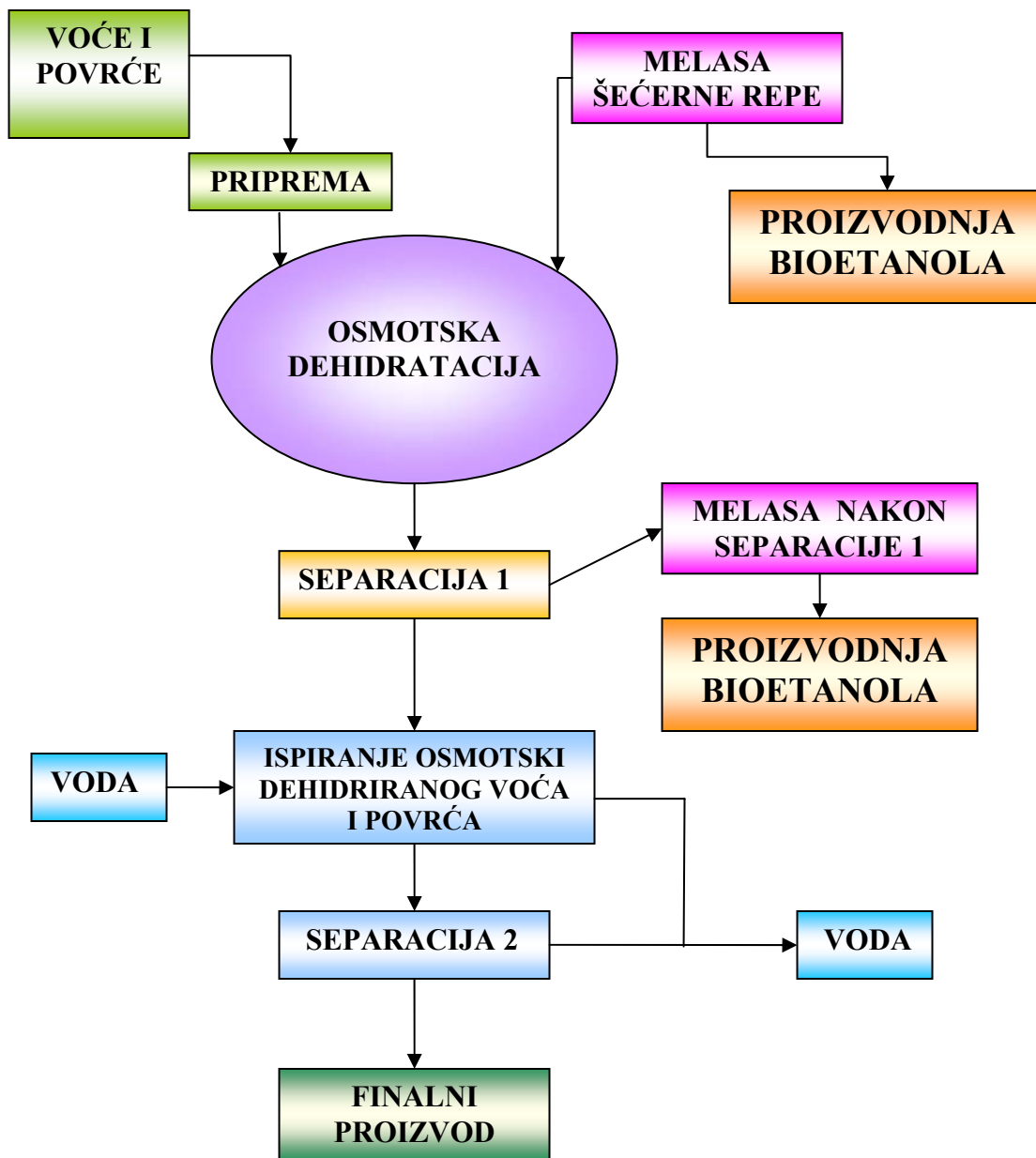
Ustanovljeno je da osmotska dehidracija u šećernom rastvoru zahteva dva do tri puta manje energije u odnosu na sušenje (Lazarides, 2001). Najveće ograničenje u industrijskoj primeni osmotske dehidracije je cena i potreba za velikim količinama osmotskih rastvora (Rastogi i sar., 2002), te upravo zbog toga, neophodno je pronalaženje drugih sirovina. Jedna od tih jeste i melasa šećerne repe.

Melasa šećerne repe je nutritivno bogatija od rastvora saharoze i NaCl, senzorski prihvatljiva, uvek dostupna i jeftina sirovina. Melasa šećerne repe se može koristiti u procesu osmotske dehidracije bez prethodne pripreme i samim tim se štedi na vremenu i energiji. U dosadašnjoj praksi je osmotski rastvor, nakon procesa osmotske dehidracije, predstavljao industrijski otpad i potencijalni zagađivač okoline, a njihova obrada je povećavala troškove proizvodnje. Tokom osmotske dehidracije voća i povrća povećava se sadržaj vode u melasi, ali takođe pojedini sastojci voća ili povrća difunduju u rastvor melase.

Melasa nakon osmotske dehidracije voća i povrća usled visokog sadržaja šećera predstavlja dobar supstrat za proizvodnju etanola, pri čemu se usled većeg sadržaja vode i manjeg viskoziteta ostvaruje ušteda procesne vode i energije za pripremu podloga za fermentaciju (Lević i sar., 2008).

Uobičajena šema osmotske dehidracije voća i povrća i proizvodnje etanola iz melase nakon osmotske dehidracije je prikazana na slici 2.3.

Pojedine komponente voća i povrća koje tokom osmotske dehidracije difunduju u melasu, takođe, predstavljaju hranljive materije za kvasac i imaju pozitivno dejstvo na metabolizam kvasca, dok neke komponente mogu imati negativan uticaj na kvasac. Uticaj ovih komponenti na kvalitet melase kao supstrata za alkoholnu fermentaciju nije bio predmet istraživanja, pa stoga primena melase nakon osmotske dehidracije za proizvodnju etanola predstavlja novinu i način da se još efikasnije iskoristi ovaj nusproizvod procesa prerade šećerne repe.



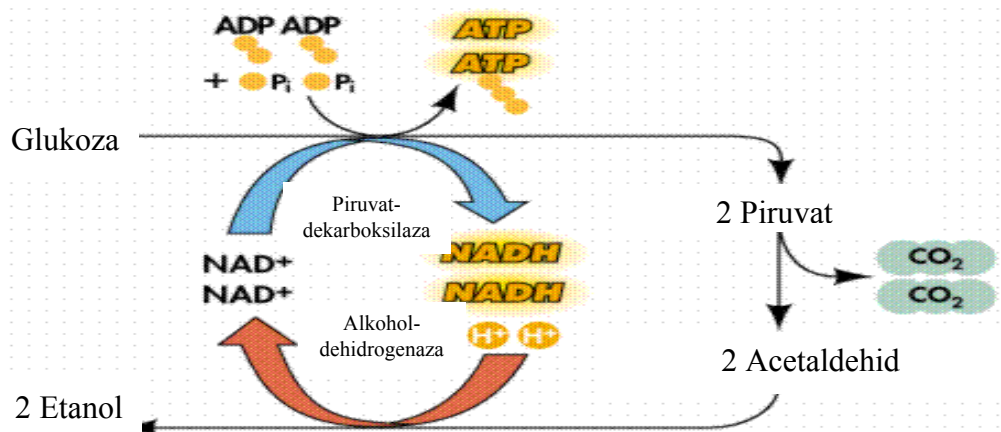
Slika 2.3. Šema procesa osmotske dehidracije i proizvodnje etanola iz melase nakon osmotske dehidracije voća i povrća (Lević i sar., 2008).

2.3. Alkoholna fermentacija pomoću ćelija *Saccharomyces cerevisiae*

Naučno objašnjenje procesa fermentacije dao je prvi put naučnik Louis Pasteur svojom tzv. "vitalnom teorijom vrenja", prema kojoj je proces fermentacije životna pojava anaerobnog disanja kvasca, u kojoj dolazi do razgradnje šećera u alkohol i ugljendioksid. Tada je došlo i do otkrića da kvasci mogu da žive i vrše metaboličku aktivnost i u aerobnim i u anaerobnim uslovima, odnosno u prisustvu i u odsustvu vazduha, odnosno kiseonika, pri čemu u zavisnosti od prisustva i količine kiseonika, proizvode različite metabolite. Tokom alkoholne fermentacije pomoću ćelija *S. cerevisiae* odvija se prevođenje monosaharida u etanol i ugljendioksid uz ograničeno povećanje biomase kvasca i oslobađanje određene količine energije (Najafpour i sar., 2004). Alkoholna fermentacija je anaeroban biohemijski proces u kome se delovanjem enzima kvasnih ćelija od glukoze dobijaju etanol i ugljendioksid uz oslobađanje energije prema Gay-Lussacovoj jednačini:



gde je ΔG slobodna entalpija. Fermentacija je egzogeni proces u kojem se oslobađa energija, dobijena kao hemijska energija u ćelijama kvasca i koristi se u obliku ATP-a (adenozintrifosfata) ili se oslobađa kao toplotna energija (egzotermni proces) (Walker, 1998). Kvasci pod anaerobnim uslovima metabolišu glukozu koja se u ćelijskoj citoplazmi nizom enzimski katalizovanih reakcija oksidativno prevodi do piruvata Embden-Mereyhof-Parnas metaboličkim putem. Ovaj proces se naziva glikoliza. Nastali piruvat se dejstvom enzima piruvatdekarboksilaze prevodi do acetaldehida uz izdvajanje CO_2 . Dejstvom enzima alkoholdehidrogenaze acetaldehid se dalje prevodi do etanola. NAD^+ utrošen na početku EMP metaboličkog puta se regeneriše prilikom prevođenja acetaldehida u etanol (Slika 2.4.) pa je stoga anaerobna fermentacija glukoze u etanol redoks neutralna (Russel, 2003). Alkoholnom fermentacijom jednog mola glukoze nastaju dva mola etanola, dva mola ugljendioksida i dva mola ATP-a koji se utroše na anaboličke reakcije ćelije kvasca i njen rast.



Slika 2.4. Alkoholna fermentacija (<http://chemcases.com/alcohol/alc-03.htm>).

Proizvodnja etanola je usko povezana sa rastom ćelija kvasca. U slučaju prestanka rasta ćelija došlo bi do intracelularne akumulacije ATP-a koji inhibira dejstvo fosfofruktokinaze (FFK), jednog od ključnih enzima za regulaciju glikolize, pa samim tim dolazi do prestanka glikolize, odnosno prestanka alkoholne fermentacije (Bai i sar., 2008).

U alkoholnoj fermentaciji, gde su biokatalizatori ćelije kvasca, odigravaju se istovremeno potrošnja supstrata, rast i razmnožavanje ćelija kvasca i sinteza primarnih i sekundarnih metabolita. Ćelije kvasca u fazi rasta proizvode etanol 30 puta brže od ćelija koje ne rastu (Kelsall i Lions, 2003). Iz 180 g glukoze alkoholnom fermentacijom nastaje 92 g etilalkohola i 88 g CO₂, odnosno 1 g glukoze daje teorijski 0,511 g etanola i 0,489 g CO₂ (Bai i sar., 2008). Izdvojeni CO₂ se u tehnološkom postupku može sakupiti, prečistiti i komprimovati u tečni oblik, nakon čega se može primeniti kao sredstvo za hlađenje, sredstvo za gašenje požara i kao hemijska sirovina (Kosaric i Vardar-Sukan, 2001). U praksi se u industrijskoj proizvodnji postiže 90-93% od teorijski mogućeg prinosa etanola. Ostatak glukoze koji nije utrošen na primarne proizvode fermentacije (etanol i CO₂) troši se na rast i sintezu novih kvasnih ćelija i na sporedne proizvode fermentacije. Prilikom sinteze biomase kvasca i nastanka sporednih proizvoda dolazi do preusmeravanja jednog dela intermedijera glikolize ka odgovarajućim metaboličkim putevima čime se u izvesnoj meri smanjuje prinos etanola (Ingledew, 1999). Sporedne proizvode koji se neminovno pojavljuju u krajnjem proizvodu fermentacije čine organska jedinjenja koje ćelije kvasca izlučuju u spoljnu sredinu kao svoje metabolite. U sporedne proizvode spadaju: glicerol, acetaldehid, ćilibarna kiselina i viši alkoholi. Tokom fermentacije nastaju i drugi proizvodi koji nisu posledica delovanja ćelija kvasca kao što su mlečna kiselina, sirćetna kiselina, buterna kiselina, metanol, akrolein, acetali, dok iz prisutnih kiselina i alkohola mogu nastati estri (Walker, 1998). Stepenn iskorišćenja šećera zavisi od sadržaja glukoze, temperature na kojoj se vrši fermentacija i vrednosti pH (Kosaric i Vardar-Sukan, 2001).

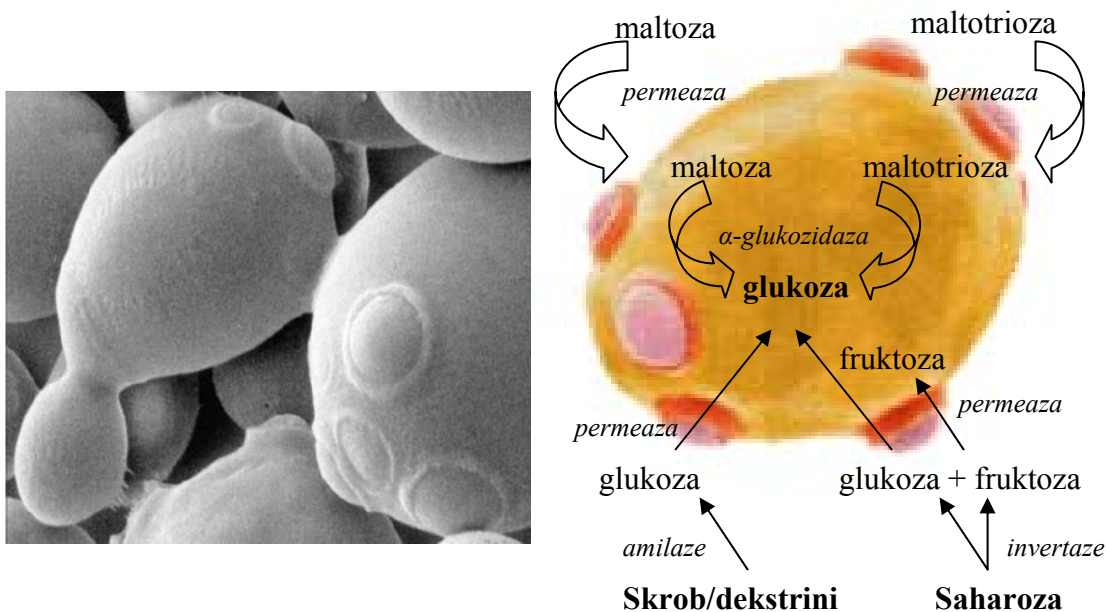
Efikasnost fermentacije zavisi od primenjenog mikroorganizma, koji bi trebalo da ima odlične fermentativne sposobnosti, što bolju sposobnost održavanja životnih aktivnosti na povišenim temperaturama, visoku tolerantnost na bioetanol, tolerantnost na niske pH vrednosti (Kosaric i Vardar-Sukan, 2001). U industriji se za proizvodnju bioetanola najčešće koriste kvasci iz roda *Saccharomyces* (Russel, 2003). *Saccharomyces* predstavlja rod u carstvu gljiva koji uključuje mnoge vrste kvasca. Naziv *Saccharomyces* potiče iz latinskog jezika (*Saccharo*-šećer i *myces*-gljiva). Tačan prikaz mesta kvasaca nazvanih *Saccharomyces* među mikroorganizmima je: *Ascomycota* > *Saccharomycetae* > *Saccharomycotina* > *Saccharomycetes* > *Saccharomycetales* > *Saccharomycetaceae* > *Saccharomyces* (Boross i sar., 2008).

Pored vrste *Saccharomyces cerevisiae* za alkoholnu fermentaciju se koriste i kvasci vrsta *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis), *Schizosaccharomyces pombe* i *Klyveromyces*, kao i bakterije *Zymomonas mobilis*, *Clostridium sporogenes* i *Thermoanaerobacter ethanolicus*, te neke plesni iz roda *Mucor* i *Fusarium* (Wyman, 1996). U poslednje vreme je velika pažnja naučnika usmerena na fermentaciju primenom *Zymomonas mobilis* i *Escherichia coli* koje su bile izložene tehnikama metaboličkog i genetičkog inženjeringa (Mussatto i sar., 2010). Koliko će dugo trajati fermentacija i sa kolikim prinosom zavisi

prvenstveno od soja i količine prisutnog kvasca, ali i od hemijskog sastava polazne sirovine, odnosno pripremljene hranljive podloge (Wiedemann i sar., 2006).

S. cerevisiae je heterotrofni mikroorganizam, kome je za rast, razmnožavanje i održavanje životnih funkcija neophodan organski ugljenik, jer nema mogućnost asimilacije i vezivanja ugljendioksida. Ovaj mikroorganizam je sposoban da živi i razmnožava se i pod aerobnim i pod anaerobnim uslovima. Vrsta metabolizma zavisi od prisustva kiseonika u hranljivoj podlozi. U odsustvu kiseonika kvasci previru šećere do etanola i ugljendioksida, a u prisustvu kiseonika kvasci potpuno razgrađuju šećer do ugljendioksida i vode. Razgradnjom šećera pod aerobnim uslovima oslobađa se oko dvadeset četiri puta više energije nego pod anaerobnim. Zbog toga se u aerobnim uslovima glukoza razgrađuje mnogo sporije nego u anaerobnim, ali sa istim energetskim efektom. Sporija razgradnja glukoze pod aerobnim uslovima je posledica Pasteur-ovog efekta. Ako je koncentracija glukoze u hranljivoj podlozi veća od 3%, čak i u prisustvu kiseonika razgradnja glukoze će se gotovo potpuno odvijati putem glikolize uz stvaranje alkohola. Kada se sva količina šećera prevede u etanol, etanol služi ćelijama kvasca kao izvor energije i ugljenika (Boross i sar., 2008).

U zavisnosti od enzimskog sistema u ćelijama, kvasci su sposobni da metabolišu različite šećere, pa tako kvasac *S. cerevisiae* ima sposobnost da metaboliše glukozu, maltozu, maltotrioazu, trehalozu, galaktozu, manozu, fruktozu i saharozu. Kvasac ne metaboliše podjednako dobro sve šećere, obzirom da složene šećere prvo mora enzimski da razgradi, kvasac najpre koristi heksoze, zatim maltoze i na kraju maltotrioze (Slika 2.5.) (Russel, 2003).



Slika 2.5. a) Ćelije *S. cerevisiae* snimljene elektronskim mikroskopom, b) usvajanje ugljenih hidrata od strane ćelija kvasca *S. cerevisiae*.

Neophodne hranljive materije za ćelije kvasca su različiti izvori neorganskog ili organskog azota. Za razliku od drugih vrsta kvasac *S. cerevisiae* nema sposobnost usvajanja nitrata, ali zato ima sposobnost usvajanja brojnih drugih azotnih jedinjenja kao što su aminokiseline, peptidi, proteini, poliamini, nukleinske kiseline i vitamini koje ćelije koriste za inkorporaciju u strukturalna i funkcionalna azotna jedinjenja ćelije. Kvasci imaju sposobnost biosinteze svih aminokiselina pa mogu da rastu koristeći samo amonijum soli kao izvore azota. Ćelije kvasca prilikom sinteze aminokiselina, u najvećoj meri glutamata i glutamina, asimiluju amonijum jone koji su prisutni u hranljivoj podlozi ili su dobijeni razgradnjom drugih azotnih jedinjenja. Glutamat nastaje dejstvom enzima NADH-zavisne glutamat dehidrogenaze iz α -ketoglutarata i amonijum jona u ATP zavisnoj reakciji. Glutamin je neophodan prekursor za važne metaboličke puteve kao što su sinteza aspargina, triptofana, histidina, arginina, karbamil-fosfata, glukozamina i nikotinamid-dinukleotida (NAD)(Walker, 1998).

Fosfor je esencijalna hranljiva komponenta koju ćelije kvasca koriste za inkorporaciju u strukturne molekule (fosfomanan i fosfolipidi, RNK i DNK) i metabolite fosforilacije (ATP i glukoza-6-fosfat). Kvasci akumuliraju polifosfate kao rezervne izvore energije koje koriste u slučaju nedostatka nutrijenata. Fosfor se obično dodaje u podlogu u vidu neorganskog ortofosfata ($H_2PO_4^-$) koji se lako metaboliše u nukleozid trifosfat (ATP), ali se može takođe dodati u vidu amonijum, natrijum ili olovnih soli. Fosfor se u podlogu dodaje tako da čini oko 1-2% suve mase ćelija po jedinici zapremine podloge za fermentaciju (Russell, 2003).

Neorganski sumpor u formi sulfatnih anjona se preko aktivnih centara lako prenosi u ćelije kvasca gde biva asimilovan u aminokiseline kao što su metionin i tripeptidi kakav je glutation. U prisustvu viška sulfata ćelije kvasca skladište sumpor intracelularno u obliku glutationa do količine od 1% na suhu masu ćelija. U uslovima nedostatka ili gladovanja ćelije kvasca koriste glutation kao izvor sumpora za biosintezu aminokiselina. Sumpor se dodaje u podlogu za fermentaciju u količini od oko 0,3-0,5% na suhu masu kvasca (Russell, 2003).

Ćelijama kvasca su za uspešan rast i fermentaciju u zavisnosti od soja, sastava podloge, i hemijskih interakcija neophodni različiti mikro i makroelementi. Koncentracija makroelementata kao što su kalijum, magnezijum, kalcijum, gvožđe, cink i mangan u podlozi treba da bude 0,1-1 mM. Koncentracija mikroelemenata kao što su kobalt, bor, kadmijum, hrom, bakar, jod, molibden, nikl i vanadijum u podlozi bi trebalo da iznosi 0,1-100 μ M. Minerali kao što su srebro, arsen, barijum, živa, litijum, nikl, olovo, selen mogu imati inhibitorno dejstvo na metabolizam kvasca pri koncentracijama višim od 100 μ M (Russell, 2003).

Vitamini su važni regulatori i kofaktori metaboličkih procesa kvasca. Njihova primarna funkcija je enzimska i oni deluju kao koenzimi ili prekursori za aktivne enzime. Vitamini kao što su biotin, Ca-pantotenat, tiamin, inozitol, niacin, piridoksin, piridoksal, piridoksamin i riboflavin imaju katalitičku funkciju u metabolizmu kvasca. Esencijalni vitamini za visoku fermentacionu aktivnost su različiti za svaki soj kvasca, dok gotovo svi sojevi imaju potrebe za biotinom i pantotenatom (Russell, 2003).

Opšte posmatrano, faktori od kojih u velikoj meri zavisi metabolizam kvasaca su sledeći (Walker, 1998) :

- Genetske karakteristike, odnosno izbor soja kvasca,
- Fiziologija ćelija, tj. tolerancija ćelija na stres (osmotski stres, toplotni, oksidativni, stres usled gladovanja, stres usled niske pH vrednosti ili prisustva organskih rastvarača, uključujući toksični efekat etanola), viabilnost, vitalnost i gustina ćelija u inokulumu,
- Ishrana, sadržaj i oblik asimilujućeg azota, prisutni šećeri, dostupnost i sadržaj metalnih jona,
- Uticaj spoljašne sredine (fizički faktori), temperatura, pH, sadržaj rastvorenog kiseonika i gustina podloge.

Efikasnost alkoholne fermentacije se može povećati na nekoliko načina (Walker, 1998):

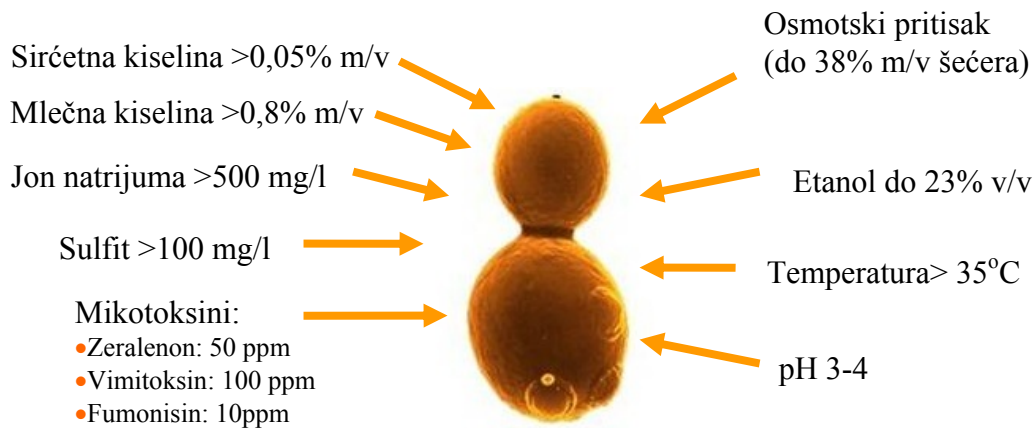
- Povećanjem broja ćelija u inokulumu,
- Smanjenjem inhibitornih efekata,
- Povećanjem životnih aktivnosti ćelija,
- Primenom genski usavršenih ćelija kvasca,
- Odabirom alternativnih mikroorganizama,
- Modifikacijom fermentora i procesa.

U najznačajnije pravce razvoja proizvodnje bioetanola fermentacijom spadaju primena tzv. VHG tehnologije, fermentacija lignoceluloznih hidrolizata i primena visoke koncentracije kvasca u kontinualnim procesima fermentacije (Musscatto i sar., 2010).

Alkoholna fermentacija podloga sa visokim i veoma visokim koncentracijama šećera (VHG) je jedan od načina da se ostvari visoka koncentracija etanola i visoka produktivnost procesa uz uštedu energije prilikom izdvajanja etanola i obrade otpadne džibre (Wang i sar., 2007). U industriji etanola teži se postizanju visokih koncentracija etanola kao primarnog metabolita kvasca u postupku alkoholne fermentacije. Na taj način se ostvaruju značajne uštede energije u sledećoj proizvodnoj fazi, odnosno u postupku izdvajanja etanola destilacijom iz fermentisane podloge kao i uštede energije za obradu džibre kao otpadnog toka (Bai i sar., 2009). Fermentisane podloge pored etanola sadrže brojne druge isparljive komponente (kiseline, estre, aldehide, više alkohole, furfural), kao i neisparljive komponente (ugljene hidrate, proteine, ćelije kvasca itd.) Procesi destilacije i rektifikacije, kao i daljeg prečišćavanja etanola su ekonomski i energetska najzahtevnije faze u proizvodnji bioetanola. Zbog toga je vrlo važno da fermentisana podloga koja odlazi na destilaciju ima što je moguće veću koncentraciju etanola (Madson, 2003). Klasičnim postupcima destilacije i rektifikacije se postiže koncentracija etanola od oko 96%, takozvani neanhidrovani etanol, koji je neprihvatljiv kao motorno gorivo. Za direktno mešanje sa benzinom etanol mora biti potpuno dehidrovan (engl. fuel grade). Za dobijanje anhidrovanog bioetanola koriste se sledeći tehnološki postupci: azeotropna i ekstraktivna destilacija, dehidratacija adsorpcijom (molekulska sita), dehidratacija korišćenjem membranske tehnologije ili pervaporacija, ili kombinovani postupci (Swain, 2003).

Uglavnom se u industrijskoj proizvodnji etanola koristi početna koncentracija od 160 do 180 g/l šećera, dok VHG tehnologija podrazumeva pripremu i fermentaciju smeša sa sadržajem šećera iznad 250 g/l (Najafpour i sar., 2004, Bayrock i Ingledew, 2001). Kvasac *S. cerevisiae* koji se obično koristi za proizvodnju bioetanola zadržava sposobnost fermentacije pri uslovima visoke koncentracije šećera kada je u podlozi obezbeđena dovoljna količina nutrijenata (Bafrcová i sar., 1999).

Tokom VHG fermentacije ćelije kvasca su izložene ekstremnim uslovima kao što su visok osmotski pritisak, toksični efekat etanola, nedostatak nutrijenata, naročito rastvorenog kiseonika i azota, povećan viskozitet i visoka koncentracija ugljendioksida (Pátková i sar., 2000). Nepovoljni spoljašnji uslovi koji tokom fermentacije izazivaju stres ćelija kvasca tzv. faktori stresa su prikazani na slici 2.6. (Kellsal i Lions, 2003; Ingledew, 1999).



Slika 2.6. Faktori koji izazivaju stres ćelija *S.cerevisiae* tokom fermentacije (Rusell, 2003).

Visoke koncentracije šećera u podlozi izazivaju osmotski stres ćelija kvasca pri čemu u kvascu dolazi do aktivacije pojedinih metaboličkih puteva kao specifičnog metaboličkog odgovora (Yue i sar., 2010). Povećanjem koncentracije šećera u podlozi iznad 250 g/l dolazi do inhibicije metabolizma *S. cerevisiae*, dok pri koncentraciji šećera 400 g/l dolazi do potpunog prestanka rasta ćelija kvasca (Ergun i Mutlu, 2000). Poznato je da kvasac tokom fermentacije može da proizvede 10-12% v/v etanola, ali postoje literaturni podaci da se mogu postići i više koncentracije etanola iznad 20% v/v pa čak i do 23,8% v/v (Thomas i Ingledew, 1992; Ingledew, 1999). Pri koncentraciji etanola 11-12% smanjuje se broj ćelija koje se razmnožavaju pupanjem (Mojović i sar., 2007). Kao odgovor na stres usled visoke koncentracije etanola ćelije kvasca adaptiraju svoj intracelularni metabolizam u cilju postizanja dinamičkog balansa. Toksično dejstvo etanola se dodatno intenzivira u prisustvu sporednih proizvoda fermentacije kao što su acetaldehid, acetati i visoka temperatura (Bai i sar., 2004).

Optimalna temperatura za fermentaciju primenom *S. cerevisiae* je 35 °C, a za rast 28 °C, mada su u novije vreme dostupni sojevi čija je optimalna temperatura razmnožavanja 35 °C. Fermentacijom na temperaturama 35-40 °C smanjuje se stabilnost ćelija kvasca i produktivnost etanola, ali se ostvaruje značajna ušteda troškova hlađenja bioreaktora u fabrikama etanola. Međutim, ukoliko ne postoji mogućnost intenzivnog hlađenja i precizne regulacije temperature u fermentoru pri povećanju temperature iznad 35 °C dolazi do nagle depresije fermentacije i inhibicije metabolizma kvasca. Pored toga povišene temperature pogoduju razvoju mlečnokiselih bakterija i pojačavaju stres usled mikotoksina i visoke koncentracije soli. U slučaju infekcije mlečnokisele bakterije kao i druge kontaminirajuće bakterije proizvode mlečnu i sirćetnu kiselinu u značajno većoj meri nego ćelije *S. cerevisiae*. Visoke koncentracije ovih kiselina dovode do opadanja vrednosti pH u fermentacionoj podlozi i samim tim predstavljaju važan faktor stresa ćelija kvasca (Kelsall i Lions, 2003). Optimalna vrednost pH za alkoholnu fermentaciju ćelijama *S. cerevisiae* je u opsegu između 4,0 i 6,0 dok ćelije mogu da rastu u širokom opsegu vrednosti pH od 2,5 do 8,5 (Narendranath i Power, 2005). Pored navedenih faktora stresa i povećanje koncentracije ugljen-dioksida u podlozi iznad 2,23% v/v dovodi do inhibicije rasta *S. cerevisiae*, intenzivne produkcije sporednih isparljivih proizvoda fermentacije i inhibicije usvajanja aminokiselina (Russell, 2003).

Ćelije kvasca mogu da tolerišu pojedine vrste stresa. Međutim, tokom fermentacije veoma često dolazi do simultanog dejstva više faktora stresa koji prouzrokuju opadanje viabilnosti ćelija kvasca i prinosa etanola (Kellsal i Lions, 2003; Bai i sar., 2008). Pod dejstvom stresa dolazi do promene biohemijskog sastava ćelija kvasca koja podrazumeva akumulaciju trehaloze i glicerola, opadanje sadržaja proteina i glikogena i izmenjeni sastav sterola i masnih kiselina (Pátaková i sar., 2000).

Pri osmotskom i toplotnom stresu ćelija kvasca dolazi do intenzivne sinteze i akumulacije glicerola (HOG, engl. high osmolarity glicerol response) tako da on u ćelijama u zavisnosti od uslova sredine iznosi 1,2-1,5% (Russell, 2003). Glicerol je posle etanola i ugljen-dioksida kvantitativno najzastupljeniji proizvod alkoholne fermentacije (Bai i sar., 2008). Sinteza biomase i organskih kiselina tokom fermentacije prouzrokuje akumulaciju intracelularnog NADH. Glicerol održava ravnotežni redoks potencijal u ćeliji reoksidacijom viška nastalog NADH u NAD⁺, a takođe ima i ulogu zaštitnika od osmotskog stresa (Yue i sar., 2010).

Pored glicerola zaštitnu funkciju u ćelijama *S. cerevisiae* ima disaharid trehaloza koji se akumulira u ćelijama kvasca u kasnoj stacionarnoj fazi rasta, tokom nagle promene spoljašnjih uslova i tokom sporulacije. Jedini šećer prisutan u sporama je trehaloza. Trehaloza štiti ćelije u uslovima nedostatka hranljivih materija, od dejstva toksičnih komponenti (etanol, kiseonični radikali, teški metali), od visokih i niskih temperatura kao i tokom gladovanja (Russell, 2003). Mehanizam pomoću kojeg trehaloza posreduje u toleranciji na isušivanje nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da izaziva određene efekte na lipidima i proteinima ćelijskih membrana čime se povećava stabilnost membrane. Pekarski kvasac može akumulirati trehalozu u količinama i do 13% ukupne suve mase ukoliko mu nedostaje ugljenika ili azota. Kvascima trehaloza omogućava preživljavanje uslova skoro potpune dehidracije (0,1% H₂O) (Aranda i sar., 2004).

Visoka produktivnost VHG fermentacije i prevazilaženje stresnih uslova se postiže primenom visoke koncentracije ćelija kvasca, viših temperatura fermentacije, aeracijom podloge i primenom imobilisanih ćelija *S. cerevisiae* (Pátaková i sar., 2000). Pored toga sposobnost kvasca da proizvede visoke koncentracije etanola u velikoj meri zavisi od sastava podloge za fermentaciju kao i od prisustva pojedinih hranljivih materija koje imaju zaštitnu funkciju.

Prethodna istraživanja pokazala su da azotna jedinjenja, naročito amonijum-soli imaju izrazitu zaštitnu ulogu jer pozitivno utiču na rast, vijabilnost i fermentativnu sposobnost kvasca (Bai i sar., 2008; Jones i Ingledew, 1994). Dodatkom izvora azota ne može se ubrzati usvajanje šećera iz podloge tokom VHG fermentacije, ali se sprečava formiranje sporednih produkata fermentacije i na taj način se povećava prinos etanola. Suplementacijom amonijum soli i uree kao izvora azota u podlogu za fermentaciju povećava se brzina specifičnog rasta *S. cerevisiae*, tolerancija na etanol, prinos etanola uz smanjenu produkciju nusproizvoda fermentacije (Yue i sar., 2010). Suplementacija aminokiselina u velikoj meri doprinosi toleranciji ćelija kvasca na stres, pa samim tim pozitivno utiče na rast ćelija kvasca i proizvodnju etanola u VHG uslovima (Bai i Zhao, 2012). Takođe, mineralne materije kao što su soli kalcijuma, magnezijuma, cinka i bakra i vitamini kao što su inozitol, tiamin, piridoksin, biotin i Ca-pantotenat kao i njihove smeše pozitivno utiču na rast, viabilnost i fermentativnu sposobnost ćelija kvasca (Nikolić i sar., 2009a). Prisustvo jona magnezijuma je od izrazite važnosti za smanjenje štetnog dejstva etanola i toplote na ćelije *S. cerevisiae* tokom VHG fermentacije. Stresni efekat toplote i etanola ogleda se u razgradnji ćelijske jonske homeostaze, što dovodi do gubitka metaboličkih aktivnosti kvasca. Međutim, joni magnezijuma reaguju sa fosfolipidima ćelijske membrane čime se smanjuje permeabilnost protona i anjona i u velikoj meri povećava stabilnost plazmaleme. Stoga je prisustvo jona magnezijuma u VHG fermentaciji od velikog značaja (Birch i Walker, 2000).

Primena imobilisanih ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji je oblast istraživanja koja se brzo razvija zbog svojih brojnih tehničkih i ekonomskih prednosti u poređenju sa primenom slobodnih ćelija, naročito u kontinualnom postupku fermentacije (Verbelen i sar., 2006; Kourkoutas i sar., 2006). Primenom imobilisanih ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji moguće je ostvariti visoku koncentraciju aktivne biomase, kao i dobar kontakt između ćelija i hranjive podloge, čime se postiže visoka produktivnost fermentora, poboljšanje stabilnosti procesa i dobijanje proizvoda ujednačenog kvaliteta (Mallouchos i sar., 2007). Pored toga, pri VHG uslovima fermentacije imobilisane ćelije pokazuju značajno višu produktivnost od slobodnih ćelija (Pátaková i sar., 2000; Bai i sar., 2009)

2.4. Imobilisane ćelije *S. cerevisiae*

Imobilizacija je postupak kojim se biokatalizatori (enzimi ili ćelije mikroorganizama), fizičkim ili hemijskim putem pričvršćuju za površinu ili se umrežavaju unutar strukture određenog nerastvorljivog nosača. Opsežna istraživanja sprovedena u poslednje dve-tri decenije svedoče o velikom interesovanju naučne i stručne javnosti, kao i o velikom potencijalu primene imobilisanih ćelijskih sistema za izvođenje čitavog spektra različitih procesa u oblasti proizvodnje hrane i aditiva, fermentisanih pića, aminokiselina, organskih kiselina, hemikalija, farmaceutskih proizvoda, zaštite životne sredine, pa do sasvim specifičnih aplikacija u medicini (Boross i sar., 2008).

Dobijanje i primena imobilisanih ćelija mikroorganizama i enzima nije nova pojava. Jedan od najstarijih primera primene imobilisanih ćelija je brzi postupak proizvodnje sirćetne kiseline, koji je opisao Schützenbach 1823. godine. U ovom postupku korišćene su perforirane kade ispunjene piljevinom od bukve. Na površini piljevine je nastao biofilm sirćetnih bakterija. Ćelije u biofilmu su oksidovale etanol u sirćetnu kiselinu. Takođe, primena imobilisanih ćelija odavno je deo procesa prečišćavanja otpadnih voda. Razvoj savremenih postupaka je počeo 70-ih godina prošlog veka. Prva industrijska primena datira od 1973., kada su Chibata i saradnici proizvodili L-asparaginsku kiselinu od fumarne kiseline, pomoću imobilisanih ćelija *Escherichia coli*. Ista grupa naučnika je rešila dobijanje L-jabučne kiseline od fumarne kiseline korišćenjem vezanih ćelija *Brevibacterium ammoniagenes* (Boross i sar., 2008).

Velika pažnja naučne javnosti usmerena je ka razvoju novih metoda za dobijanje imobilisanih ćelija, razvoju bioreaktora sa imobilisanim biokatalizatorima, razvoju novih tehnika, ispitivanju rešenja materijalnih i energetskih problema vezanih za tehniku imobilizacije. Imobilisane ćelije mikroorganizama se danas kao svojevrsni biokatalizatori ispituju i primenjuju u mnogim fermentacionim procesima, kao što su proizvodnja etanola, piva, (penušavog) vina, jabukovog vina, sirćeta, pirinačnog piva (sake-a) itd (Nedović, 1999).

Veoma je važno da u toku procesa imobilizacije ćelije mikroorganizama očuvaju viabilnost i metaboličke aktivnosti. Imobilizacijom ćelija kvasca omogućava se maksimalno koncentrisanje biomase u fermentoru i efikasan kontakt između ćelija i hranjive podloge. Kao rezultat dobija se stabilan proces fermentacije, visoka produktivnost fermentora i ujednačen kvalitet krajnjeg proizvoda. Ovim postupkom se u bioreaktoru mogu ostvariti visoke koncentracije aktivne biomase, što dovodi do postizanja visoke produktivnosti i povećanja stabilnosti procesa kao i dobijanja krajnjeg proizvoda ujednačenog kvaliteta (Verbelen i sar., 2006).

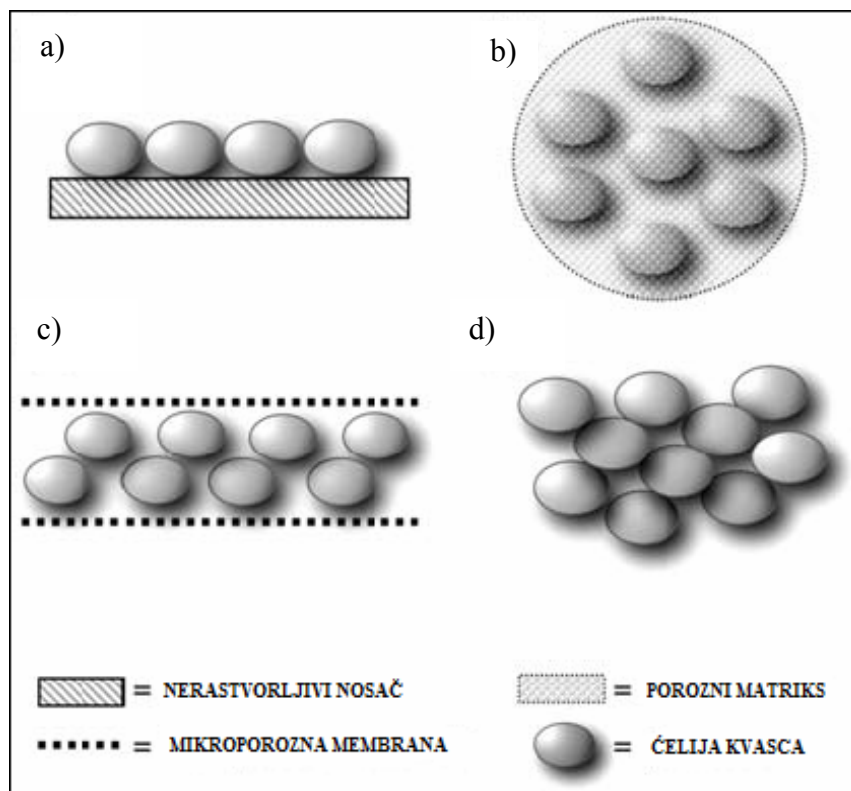
Pravilan izbor nosača za imobilizaciju ćelija je jedan od osnovnih preduslova za dobijanje proizvoda zadovoljavajućeg kvaliteta. Nosači za imobilizaciju ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji moraju da ispunjavaju sledeće uslove (Kourkoutas i sar., 2004):

- Nosač mora imati veliku specifičnu površinu bogatu funkcionalnim grupama za adsorpciju ćelija kvasca.
- Manipulacija nosačem i njegova regeneracija mora biti laka i jednostavna.
- Viabilnost ćelija kvasca kao i operativna stabilnost imobilisanog biokatalizatora mora biti na visokom nivou u dužem vremenskom periodu.
- Biološka aktivnost imobilisanih ćelija ne sme biti značajno ugrožena procesom imobilizacije.
- Poroznost nosača mora biti uniformna i dovoljna da se omogući slobodan transport supstrata, produkata, kofaktora i gasova kroz nosač.
- Nosač mora imati dobru mehaničku, hemijsku, termičku i biološku stabilnost, mora biti otporan na dejstvo enzima, rastvora i promene pritiska.
- Nosač i tehnika imobilizacije moraju biti jednostavni, jeftini i primenjivi u velikim razmerama.
- Nosač mora biti odgovarajuće nutritivne čistoće (*food grade*) i ne sme uticati na kvalitet proizvoda tako da on bude neprihvatljiv za konzumente.

2.4.1. Metode imobilizacije ćelija kvasca

U zavisnosti od prirode interakcija koje deluju između biokatalizatora i nosača, kao i od jačine veze, razlikuju se fizička i hemijska imobilizacija biokatalizatora (enzima ili mikroorganizama). U fizičku imobilizaciju spadaju: smeštanje ćelija iza polupropustljivih barijera, umrežavanje ćelija unutar gela i između šupljih vlakana polimera, mikroinkapsulacija i kapsulacija, formiranje lipozoma, samoagregacija i adsorpcija na nosačima velike površine. U hemijske postupke imobilizacije spadaju: jonsko vezivanje, formiranje kovalentnih veza, intermolekularno kovalentno vezivanje između biokatalizatora, inkorporiranje u strukturu polimera, formiranje helata sa prelaznim metalima (Boross i sar., 2008). Mnogi aspekti primene različitih metodologija imobilizacije su detaljno istraživani, uključujući i njihov uticaj na mikrobni rast i fiziologiju, ograničenja internog i eksternog prenosa mase, kvalitet proizvoda, dizajna bioreaktora i ekonomije čitavog procesa proizvodnje (Mussatto i sar., 2010).

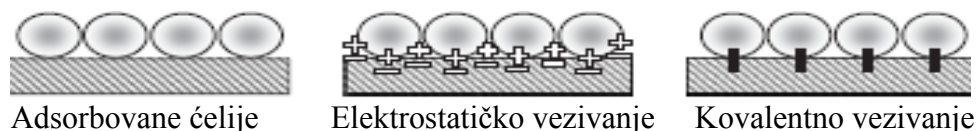
Najzastupljenije metode imobilizacije ćelija kvasca se generalno mogu podeliti u četiri osnovne kategorije na osnovu prirode i mehanizama ćelijske lokalizacije na nosaču (Slika 2.7.): a) imobilizacija na nerastvornim nosača, b) umrežavanje u poroznom matriksu, c) zadržavanje iza mikroporoznih barijera, c) flokulacija odnosno samoagregacija kvasca.



Slika 2.7. Osnovne metode imobilizacije ćelija kvasca: a) imobilizacija na nerastvorljivom nosaču, b) umrežavanje u poroznom matriksu, c) zadržavanje iza mikroporoznih barijera, d) flokulacija odnosno samoagregacija kvasca (Verbelen, 2006).

2.4.1.1. Adsorpcija na nerastvorljivim nosačima

U ovoj vrsti imobilizacije, ćelije kvasca se najčešće vezuju za površinu čvrstih nosača. Različiti nosači se mogu koristiti u tu svrhu. Prirodna imobilizacija je vrlo jednostavna i odvija se u blagim uslovima, ali je intenzitet vezivanja ćelija znatno slabiji u poređenju sa umrežavanjem ćelija u strukturu polimera. Ćelijska adsorpcija na nosače može biti izazvana Van-der-Walsovima i elektrostatičkim interakcijama između ćelija kvasca i površine nosača. Prirodna adsorpcija ćelija kvasca na nosačima još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali je ona svakako rezultat elektrostatičkih sila ili rezultat formiranja kovalentnih veza između površine nosača i ćelijske membrane (Slika 2.8.) (Kourkoutas i sar., 2004). Fenomen prirodne adhezije kvasca na nerastvorljivim nosačima je delom rezultat adsorpcije ćelija kvasca usled elektrostatičkih, jonskih i hidrofobnih interakcija, ali je takođe i rezultat zadržavanja ćelija u šupljinama nosača kapilarnim silama. Flokulacija kvasca predstavlja veoma važan faktor ćelijske imobilizacije prirodnom adhezijom. Dakle, fizičko-hemijska svojstva ćelijskog zida kvasca i nosača, kao što su hidrofobnost, elektron-donorska i elektron-akceptorska svojstva, moraju se uzeti u obzir prilikom izbora nosača za imobilizaciju (Verbelen i sar., 2006).



Slika 2.8. Imobilizacija ćelija kvasca adsorpcijom na površinu nerastvornih nosača (Kourkoutas i sar., 2004).

Nerastvorni nosači za ovaj metod imobilizacije se mogu podeliti u dve grupe (Nedović, 1999):

- Nosači sa porama malih dimenzija koje onemogućuju da ćelija prodre unutar nosača, pa mikroorganizme veže na svoju površinu.
- Nosači sa dovoljno velikim porama koji omogućuju adsorpciju ćelija i po površini i unutar strukture nosača.

U slučaju primene nosača sa velikim porama ćelijama je dopuštena difuzija u pore nosača. Nakon što ćelije počnu da rastu, njihovu mobilnost ometa prisustvo drugih ćelija, i tako bivaju zadržane u matriksu (Nedović, 1999). Nosači za imobilizaciju ćelija kvasca adsorpcijom na površinu moraju biti čvrsti i nerastvorni u podlozi za fermentaciju kao i biološki inertni. Adsorpcija ćelija na površinu nosača može biti pospešena dodatkom različitih agenasa, kao što su: oksidi metala, glutaraldehid ili aminosilani. U proizvodnji alkoholnih pića i etanola izbegava se primena ovih agenasa jer su potencijalno štetni i loše utiču na stabilnost procesa fermentacije. Imobilizacija ćelija kvasca prirodnom adsorpcijom na površinu je veoma jednostavna, jeftina i ne zahteva specijalne uslove, ali je količina imobilisanih ćelija po jedinici mase nosača kvasca značajno manja u poređenju sa ćelijama imobilisanim umrežavanjem u matricu polimera (Verbelen i sar., 2006). Debljina filma kvasca na površini nosača varira od debljine monosloja ćelija do oko 1 mm u zavisnosti od prirode i intenziteta sila kojima su ćelije vezane za nosač. Međutim, kako ne postoje barijere između ćelija kvasca i rastvora moguća je desorpcija i ispiranje ćelija kvasca sa nosača sve do postizanja ekvilibrijuma između adsorbovanih i slobodno suspendovanih ćelija kvasca (Kourkoutas i sar., 2004).

Faktori koji mogu da utiču na intenzitet adsorpcije ćelija kvasca na određeni nosač pa samim tim i na desorpciju ćelija su: promena pH podloge tokom trajanja procesa, promena temperature, mešanje faza unutar sistema, kao i pojava abrazije izazvana bilo međusobnim kontaktom čestica nosača bilo kontaktima čestica sa zidovima reaktora. Ispiranje ćelija sa nosača u najvećoj meri definiše brzina protoka supstrata kroz reaktor jer utiče na pojavu turbulencije tečne faze koja protiče pored imobilisanog sloja ćelija, stoga je ova pojava nepoželjna u kontinualnim postupcima fermentacije u kojima je potrebno da efluent ne sadrži ćelije kvasca (Nedović, 1999). Međutim, kako ćelije kvasca imobilisane adsorpcijom na površinu nosača mogu neometano da rastu, desorbovane ćelije mogu biti isprane iz fermentacionog sistema i kontinualno obnovljene, pa vraćene u sistem. Dodatno,

primenjeni nosači se lako čiste i mikrobiološka kontaminacija može biti sprečena (Verbelen i sar., 2006).

Materijali koji se mogu koristiti kao nosači pri ovom postupku imobilizacije mogu se svrstati u (Nedović, 1999; Kourkoutas i sar., 2004):

- **materijale neorganskog porekla**

različiti metali, oksidi metala, silicijumoksid, staklo, staklena vuna, sinterovano porozno staklo, Rašigovi prstenovi, keramika, porozne keramičke čestice, glina, zeolit, porozna cigla.

- **materijale organskog porekla**

drvena strugotina, celuloza i njeni derivati (dietil-aminoetil (DEAE) celuloza), različiti celulozni materijali biljnog porekla, prirodni sušer, aktivni ugalj, pamučna vlakna, jonoizmenjivačke smole, plastični materijali, polikarbonat, poliestri, želatin, agar, dekstran.

2.4.1.2. Umrežavanje u poroznom matriksu polimera

Primenom ove metode porozni matriks se sintetiše na licu mesta oko ćelija. Najčešće se za ovu svrhu koriste prirodni i sintetički polimerni hidrogelovi kao što su: Ca-alginat, k-karagenan, agar, poliuretan, polistiren i polivinilalkohol (Verbelen, 2006). Umrežavanje se izvodi mešanjem suspenzije ćelija kvasca sa rastvorom polimera i njihovim dispergovanjem u vidu kapljica koje očvršćavaju. Postoje ekstruzione metode (suspenzija ćelija i polimera se propušta kroz iglu, kapilaru ili mlaznicu) i metode emulzifikacije gde se tečna faza (suspenzija ćelija i polimera) disperguje u organskoj fazi. Matrica gela treba da zadrži ćelije unutar svoje strukture i da bude dovoljno porozna kako bi se difuzija supstrata i metabolita odvijala nesmetano. Ovim postupkom je moguće postići visoku koncentraciju katalitički aktivnih ćelija po jedinici mase nosača zbog čega je metoda široko primenjivana, a nedostaci se ogledaju u maloj mehaničkoj otpornosti čestica i velikom otporu prenosa mase supstrata i produkata kroz polimer (Nedović, 1999). Polimerni nosači su obično u vidu perli sfernog oblika, prečnika u rasponu od 0,3 do 3 mm. Iako se može ostvariti veoma velika koncentracija biomase, primena polimernih matriksa je veoma retka u fermentacionoj industriji zbog nekoliko nedostataka kao što su: ograničena difuzija nutrienata, metabolita i kiseonika u matriksu gela, i povećanje gustine ćelija u kuglicama, hemijska i fizička nestabilnost gela, i nemogućnost regeneracije perli, što čini ovu kategoriju imobilizacije prilično skupom. U naučnim istraživanjima su uloženi veliki napor u rešavanju ovih nedostataka, uvođenjem novih tehnika koje su u mogućnosti da prilagode veličinu i oblik hidrogela (Verbelen i sar., 2006). U tehnologiji bioetanola se za umrežavanje ćelija *S. cerevisiae* u najvećoj meri koristi polimer Ca-alginat, pa je stoga imobilizaciji na ovom nosaču u radu posvećena posebna pažnja.

2.4.1.3. Zadržavanje iza mikroporoznih barijera

Zadržavanje kvasca iza mikroporoznih barijera može da se postigne bilo uz upotrebu mikroporoznih membranskih filtera, ili umrežavanjem ćelija u mikrokapsulama. Ovaj tip imobilizacije najviše odgovara kada se zahteva čist ćelijski produkt, ili kada proizvode velike molekulske mase treba odvojiti od efluenta. Osnovni nedostaci ove tehnike su: ograničeni prenos mase i zapuštenost pora membrane usled rasta ćelija. Ovaj tip imobilizacije je atraktivan u pogledu produktivnosti, ali je veoma skupo održavanje membrana glavni nedostatak ove tehnike (Verbelen i sar., 2006).

2.4.1.4. Flokulacija kvasca

Sojevi *S. cerevisiae* imaju prirodnu sposobnost da se vezuju za inertne površine ili da se međusobno povezuju, što se naziva flokulacija ili samoagregacija. Flokulacija kvasca je reverzibilna, aseksualna i kalcijum zavisna pojava, u kojoj se ćelije površinski vezuju jedna za drugu i formiraju flokule koje sadrže hiljade ćelija. Flokulacija kvasca je kompleksan proces koji zavisi od nekoliko specifičnih gena kao što su: FLO1, FLO5, FLO8 i Lg-FLO1 (Verbelen i sar., 2006).

Zbog njihove makroskopske veličine i mase, flokule kvasca brzo sedimentiraju iz fermentisane podloge, čime se obezbeđuje prirodna imobilizacija ćelija. Upotreba flokuletnih sojeva je veoma atraktivna, zbog svoje jednostavnosti i niske cene. Na prirodnu sposobnost flokulacije pojedinih mikroorganizama utiču brojni faktori kao što su genetske osobine, struktura ćelijskog zida, površinski naboj i faza rasta kvasca, intenzitet strujanja, temperatura, pH, koncentracija Ca^{2+} jona i koncentracija hranljivih materija u podlozi za fermentaciju. Dakle, sadržaj glukoze, saharoze i azotnih jedinjenja u podlozi za fermentaciju može uticati na uspeh imobilizacije. Međutim, ovi parametri još uvek nisu sistematski ispitani i veoma je teško predvideti uticaj sastava fermentacione podloge na adsorpcione i flokulacione osobine ćelija (Nedović, 1999; Verbelen i sar., 2006). Veliki agregati ćelija mogu dovesti do toga da mali broj ćelija bude katalitički aktivan usled otpora difuziji supstrata ka ćelijama unutar agregata (Nedović, 1999). Iznad svega, flokulacija je fenomen specifičan za svaki soj kvasca.

Flokulacija kvasca ima veoma važan uticaj na aktivnu imobilizaciju na različitim nosačima: snažno flokulišuće ćelije se brže akumuliraju i vezuju i za nerastvorne nosače. Dakle, odgovarajući izbor kvasca je važan za uspeh pojedinih metoda imobilizacije, pošto ćelije koje ne uspeju da se vežu za nosač bivaju isprane iz sistema (Verbelen i sar., 2006).

U poslednje vreme, u naučnim istraživanjima raste interes za primenom flokulacijom imobilisanih biokatalizatora u bioreaktorima (Xue i sar., 2008).

Purwadi i sar. (2007) su izvestili o uspešnom procesu kontinualne fermentacije biomase hidrolizata bez prethodne detoksikacije pomoću flokulentog soja kvasca *S. cerevisiae* koji je bio akumuliran u visokim koncentracijama u bioreaktoru. Formiranje kolonija kvasca

tokom flokulacije omogućava ćelijama da štite jedne druge od raznih inhibitora. Pretpostavlja se da ćelije koje se nalaze na spoljašnjoj strani kolonija štite druge ćelije u unutrašnjosti kolonije pretvaranjem toksičnih jedinjenja u neka druga ne toksična jedinjenja (Mussatto i sar., 2010).

Primenom flokulentnog soja *S. cerevisiae* (NCYC 1119) imobilisanog na diskovima poliuretanske pene u kontinualnom postupku alkoholne fermentacije melase šećerne trske početne koncentracije šećera 100 g/l, ostvaruje se produktivnost etanola od čak 16 g/lh, dok se primenom neflokulentnog kvasca ostvaruje produktivnost od 11 g/lh pri brzini razblaženja $D=0,4 \text{ h}^{-1}$ (Baptista i sar., 2006). U Kini, pilot i komercijalna industrijska postrojenja za dobijanje bioetanola koriste flokulentni soj kvasca SPSC01. U Americi, kontinualni sistemi fermentacije se uglavnom zasnivaju na dobijanju bioetanola iz kukuruza (Mussatto i sar., 2010).

2.4.2. Uticaj imobilizacije na fiziologiju i metabolizam ćelija kvasca

Fiziologija imobilisanih ćelija kvasca se razlikuje od fiziologije slobodnih ćelija. Neke fiziološke promene imobilisanih ćelija kvasca povoljno utiču na performanse same fermentacije, dok su druge nepovoljne. U prirodnom staništu ćelije kvasca *S. cerevisae* su pričvršćene jedna za drugu ili neku drugu površinu (npr. voće), pa se samim tim imobilizacija može posmatrati kao prirodan fenomen koji pruža određenu zaštitu od mnogih nepovoljnih uticaja na ćeliju. Negativne reakcije se odnose na stres faktore, koji su sastavni deo imobilizacije ćelija, od kojih su efekti ograničenja prenosa mase supstrata i produkata najvažniji (Verbelen i sar., 2006).

Umrežavanje ćelija u kuglicama gela ili inertnim nosačima, pokazuje slične karakteristike difuzionih ograničenja. Osobine internog prenosa mase su određene mehaničko-hemijskim karakteristikama imobilizacionog matriksa, kao što su: veličina, poroznost i tekstura. Važan parametar u proceni unutrašnjeg prenosa mase je *Thiele*-ov modul, koji se definiše kao odnos brzine utroška supstrata i brzine difuzije svežeg supstrata iz spoljnog medijuma. Kao način za prevazilaženje lošeg eksternog prenosa mase nameće se primena barbotaznog kolonskog reaktora ili reaktora sa fluidizovanim slojem. Međutim, aktivnost imobilisanih ćelija kvasca se suštinski veoma malo menja, jer je teško ukloniti efekat ograničenja prenosa mase. Za razliku od umrežavanja u polimeru, adsorpcija omogućava samo spoljni prenos mase (između medijuma i nosača), bez internog (u okviru nosača) ograničenja prenosa mase. Za potpuno prevazilaženje problema internog prenosa mase supstrata i produkata potrebno je da ćelije kvasca budu imobilisane u jednom sloju što je u praksi teško izvodljivo (Verbelen i sar., 2006).

Imobilisane ćelije imaju pojačanu metaboličku aktivnost u poređenju sa slobodnim ćelijama. Tip i priroda magnitude metaboličkih promena imobilisanih ćelija zavise od prenosa mase supstrata i produkata, intenziteta rasta, površinskog napona i uticaja osmotskog pritiska, smanjene aktivnosti vode, međućelijske komunikacije, promena morfologije ćelija, povećane permeabilnosti ćelijske membrane i dostupnosti supstrata. Imobilizacija aktivira energetske ćelijske metabolizam, povećava skladištenje polisaharida, smanjuje intenzitet ćelijskog rasta, povećava usvajanje supstrata i prinos proizvoda, smanjuje prinos sporednih proizvoda fermentacije, povećava intracelularnu pH vrednost, povećava toleranciju ćelija na toksine i inhibitorne komponente i povećava aktivnost invertaze (Kourkoutas i sar., 2004).

Poređenje metaboličke aktivnosti imobilisanih i slobodnih ćelija kvasca pokazuje aktiviranje energetskog metabolizma ćelija i povećanje skladištenja glikogena i trehaloze i strukturnih polisaharida glukana i manana. Povećanje ploediteta i sadržaja proteina u imobilisanim ćelijama, navode na zaključak da ćelija pupi i replikuje se. Međutim, povećanje skladištenja polisaharida bi se takođe moglo objasniti interakcijom između glukoze i aktivnosti enzima fosfofruktokinaze (Verbelen i sar., 2006).

Imobilisane ćelije se smatraju više tolerantnima prema etanolu nego slobodno suspendovane ćelije kvasca, što se objašnjava činjenicom da imobilisani kvasci imaju viši sadržaj zasićenih masnih kiselina u odnosu na slobodne. Povećanje sadržaja zasićenih masnih kiselina u imobilisanim ćelijama zbog izmenjenih osmotskih uslova mikrosredine je u korelaciji sa povećanjem tolerancije prema etanolu (Verbelen i sar., 2006).

Norton i sar. (1995) kao i Shen i sar. (2003) su utvrdili da matriks predstavlja zaštitu od toksičnog uticaja etanola, tako da imobilisane ćelije kvasca pokazuju veću toleranciju prema etanolu. Rezultati istraživanja na genima HSP12 i SSA3, potvrđuju da su imobilisane ćelije pod manje stresnim uslovima nego slobodne ćelije, verovatno zbog zaštite sredine. Pored toga, ovo mikrokruženje može aktivirati cAMP/PKA put, koji utiče na nakoliko načina, npr. ATF1 izaziva povećanje formacije estara. U svakom slučaju, imobilizacija ima veliki uticaj na svojstva citoplazmatske membrane kvasca, što može da dovede do promena u transportnom sistemu u ćeliji (Verbelen i sar., 2006).

Poboljšana svojstva fermentacionih sistema pomoću imobilisanih ćelija kvasca, mogu se takođe objasniti pomoću CO₂-nukleacionog efekta matriksa. Karakteristika neposrednog okruženja sredine, može da bude smanjena aktivnost vode (a_w), što predstavlja još jedan faktor stresa kvasca. Ćelije kvasca reaguju na smanjenje aktivnosti vode (a_w) lučenjem osmoprotektivnih metabolita, kao što su glicerol i prolin (Verbelen i sar., 2006). Uticaj različitih nosača, primenjenog postupka imobilizacije, konfiguracije reaktora i osobina korišćenog soja kvasca imaju različite efekte na metaboličke promene koje se dešavaju u uslovima imobilizacije (Nedović, 1999).

Konačno, za detaljnu analizu uticaja imobilizacije na metabolizam ćelija kvasca u konkretnom slučaju najviši značaj ima primena novih tehnologija i istraživanja na polju genoma kvasaca i ekspresije gena (Verbelen i sar., 2006).

2.4.3. Fermentacioni sistemi

Alkoholna fermentacija pripremljene hranljive podloge se odvija u anaerobnim uslovima u specijalno opremljenim bioreaktorima. Prema načinu doziranja podloge za fermentaciju u fermentor odnosno bioreaktor, razlikujemo sledeće postupke alkoholne fermentacije (Mojović i sar., 2007; Roehr, 2001):

- *Diskontinualni (šaržni) postupak*

U diskontinualnom postupku se u toku izvođenja fermentacije u trajanju 36-48 časova etanol proizvodi sa prinosom 90-95% od teorijskog prinosa. Finalna koncentracija etanola u fermentisanoj podlozi obično iznosi 12-16% (v/v). Prednosti ovog procesa su nizak nivo investicija, mali zahtevi u pogledu kontrole i sterilizacije, lako vođenje procesa, mali rizik od mutacija proizvodnog mikroorganizma i kontaminacije, velika fleksibilnost i dr. Među najznačajnije nedostatke ovog načina rada mogu se ubrojati: neproduktivno vreme usled pražnjenja, pranja, sterilizacije, hlađenja fermentora i njihovog ponovnog punjenja, stalna priprema inokuluma, kao i veća mogućnost kontakta osoblja sa mikroorganizmima.

- *Dolivni postupak*

Osnovna odlika dolivnog postupka fermentacije je postepeno i strogo kontrolisano doziranje hranljive podloge odnosno supstrata u definisanim vremenskim razmacima kako bi se koncentracija supstrata u bioreaktoru održala na odgovarajućem nivou. Ovakvim vođenjem postupka obezbeđuje se minimalna inhibicija supstratom jer se supstrat u sistem dovodi brzinom kojom se troši u procesu fermentacije, a proces traje dok se ne dostigne limitirajući sadržaj etanola. Ovim načinom fermentacije postižu se visoki prinosi etanola u definisanom vremenskom periodu, omogućena je visoka fleksibilnost, smanjen je rizik od mutacije proizvodnog mikroorganizma i kontaminacije i moguća je optimizacija procesa fermentacije.

- *Semikontinualni (ciklično šaržni) postupak*

Semikontinualni postupak obuhvata takozvane ulazno-izlazne, protočne procese i varijacije cikličnih fermentacija. U ovom procesu se deo sadržaja fermentora, sa proizvodnim mikroorganizmima izvodi, a umesto njega se dodaje ista zapremina sveže podloge. Ovakav proces izvodi se u više fermentora pri čemu se sadržaj prvog fermentora kao inokulum uvodi u drugi fermentor uz istovremeno vođenje procesa u prvom. Iz drugog fermentora deo sadržaja se kao inokulum uvodi u treći fermentor koji se puni i hranljivom podlogom. Prednost ovakvog rada je u visokoj fleksibilnosti, nije potreban sud za inokulum, ne treba mnogo kontrole itd. Najveći nedostatak procesa je mogućnost kontaminacije i mutacija zbog dugog trajanja procesa kultivacije.

- *Kontinualni postupak*

Kontinualni postupak fermentacije je tehnološki najinteresantniji iz razloga što se mikroorganizam nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta, tako da produktivnost etanola stalno raste. Prednosti ovog postupka su: brža fermentacija, viši stepen konverzije supstrata, smanjeni gubici proizvoda, mogućnost visoke mehanizacije i automatizacije procesa čime su značajno smanjeni zahtevi za radnom snagom, male zapremine fermentora pa samim tim i manja kapitalna ulaganja, malo habanje i oštećenje instrumenata pa time i manji troškovi održavanja, visoka produktivnost procesa jer je izbegnuto neproduktivno vreme, konstantan kvalitet proizvoda itd. Relativno mali i spor protok tečnosti u reaktor doprinosi da se ne mešaju nefermentisana tečnost i gotov proizvod. Alternativna rešenja, su konstrukcije odvojenih fermentora, zbog izbegavanja mešanja nefermentisane tečnosti i gotovog proizvoda (Verbelen i sar., 2006).

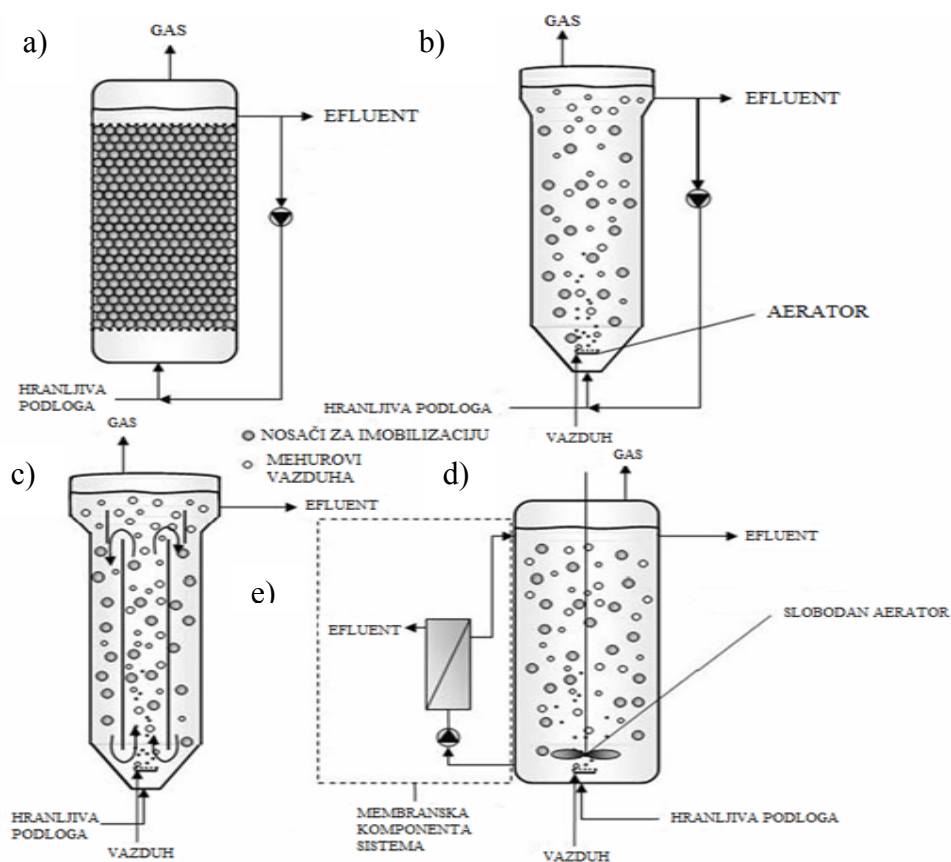
U industrijskoj proizvodnji bioetanola najviše se primenjuju diskontinualni postupci fermentacije pomoću slobodnih ćelija kvasca u cilindro-konusnim fermentorima i kontinualni postupci fermentacije u kaskadama cilindro-konusnih fermentora (Kellsal i Lions, 2003).

Kontinualna fermentacija nudi važne prednosti, kao što su: veći stepen konverzije, brži stepen fermentacije, bolja uniformnost proizvoda, smanjeni gubici proizvoda, i bolja zaštita životne sredine. Važan aspekt kontinualne fermentacije je visoka zapreminska efikasnost, koja se obično dobija povećanjem koncentracije ćelija kvasca u reaktoru. Imobilisane ćelije kvasca pružaju visoku gustinu ćelija u bioreaktoru, koja u kombinaciji sa visokim protokom, dovodi do kratkog vremena zadržavanja i visoke produktivnosti procesa. Ekonomska korist je osnovna pokretačka snaga za globalno istraživanje u cilju primene i sprovođenja kontinualne fermentacije. Prvi kontinualni fermentacioni sistem se pojavio 1960. godine, ali je samo nekoliko sistema preraslo u industrijski nivo, što ukazuje na mnoge tehničke i kvalitativne zamke u vezi ove tehnologije. Istraživačima je dostupan veliki broj metoda imobilizacije pri čemu priroda njihove primene često diktira njihov izbor. Temeljno poznavanje uticaja imobilizacije na performanse fermentacije i parametara koji utiču na imobilizaciju je od vitalne važnosti za kontinualne procese i dobijanje proizvoda prihvatljivog kvaliteta (Verbelen i sar., 2006).

Pored brojnih prednosti kontinualnih fermentacionih sistema sa imobilisanim ćelijama industrijska primena je do sada bila retka, uglavnom zbog inženjerskih problema i mikrobiološke aktivnosti, ali i cene. Ipak, pronađena su neka rešenja. Moderni procesi treće generacije kontinualne fermentacije koriste centrifuge za nadoknađivanje biomase kvasca u recirkulacionom procesu. Međutim, neke fabrike koriste kontinualne procese pomoću imobilisanih ćelija *S. cerevisiae*, čime se izbegava veoma skup postupak centrifugiranja. Kontinualni fermentacioni procesi bazirani na primeni imobilisanih ćelija kvasca imaju potencijal da maksimizuju volumetrijsku produktivnost etanola uz minimiziranje proizvodnih troškova u proizvodnji bioetanola (Musscato i sar., 2010).

2.4.4. Konfiguracije bioreaktora sa imobilisanim kvascem

Generalno, za fermentaciju sa imobilisanim ćelijama kvasca, koristi se pet vrsta reaktora. Bioreaktori sa imobilisanim kvascem su prikazani na slici 2.9.



Slika 2.9. Vrste bioreaktora sa imobilisanim biokatalizatorom (Verbelen i sar., 2006).

Bioreaktori sa imobilisanim biokatalizatorom sadrže tri faze (Verbelen i sar., 2006):

- čvrstu (nosači ili agregati),
- tečnu (medijum),
- gasnu (ugljendioksid, vazduh, kiseonik ili sl.).

Izbor bioreaktora zavisi od tipa imobilizacije, metabolizma ćelija i prenosa mase i toplote. Za kontinualnu fermentaciju primenom imobilisanih mikroorganizama najefikasniji su reaktori sa fluidizovanim slojem, ali se u najvećoj meri koriste reaktori sa kompaktnim slojem. Reaktori ili kolone sa kompaktnim slojem se odlikuju jednostavnim dizajnom i lakom manipulacijom i kontrolom fermentacije (Sheoran i sar., 1998).

U reaktoru sa kompaktnim slojem (Slika 2.9. a) supstrat prolazi naviše ili naniže kroz reaktor, odnosno kroz sloj imobilisanih ćelija kvasca. Ovaj tip reaktora ima određene prednosti kao što su jednostavnost u radu i mogućnost ostvarivanja velikih brzina reakcija. U praksi, reaktori sa slojem imobilisanog biokatalizatora su skloni ograničenom prenosu mase, teškoće u izdvajanju CO₂, kompresiji nekih nosača itd. (Verbelen i sar., 2006).

U reaktoru sa fluidizovanim slojem (Slika 2.9. b), intenzivno mešanje gasa, tečnosti i čvrstih materija dovodi do recirkulacije fermentacionog supstrata. U reaktoru sa fluidizovanim slojem dolazi do manjeg trenja čestica nosača, u odnosu na reaktore sa mehaničkim mešalicama. Protok tečnosti je direktno usmeren kroz čestice brzinom iznad minimalne brzine fluidizacije. Veoma je važno uzeti u obzir gustinu imobilisanih čestica u perlama prilikom dizajniranja ovog tipa reaktora, zato što mala razlika u gustinama nosača i medijuma može da dovede do intenzivnog ispiranja. S druge strane, velika razlika u gustinama može da poveća troškove pumpanja (Verbelen i sar., 2006).

U air-lift i barbotaznim kolonskim reaktorima (slike 2.9.c i 2.9.d) mešanje se vrši ubrizgavanjem gasa. U air-lift bioreaktoru (Slika 2.9.c) obezbeđeno je značajno intenzivnije ubrizgavanje pri istom protoku vazduha, nego u barbotaznom kolonskom reaktoru, zbog položaja cevi za hlađenje i protoka vazduha, što stvara „duže“ zone u centru reaktora. U ovim reaktorima moguća je samo primena ćelija imobilisanih umrežavanjem u polimeru ili umrežavanjem flokulacijom (Verbelen i sar., 2006).

Barbotazni kolonski reaktor (Slika 2.9. d) obezbeđuje povećanu brzinu prenosa mase. Kod ovog reaktora se mora voditi računa da se ne oštete nosači imobilisanih ćelija i da ćelije kvasca ne budu oštećene dejstvom sila smicanja. Impeleri, u obliku spiralnih traka i sidra su u prednosti u odnosu na turbine i propelere (Verbelen i sar., 2006).

Na slici 2.9. e prikazan je tipični membranski bioreaktor. U slučaju proizvodnje etanola, pervaporacija se često primenjuje kao membranski separacioni proces, u kojem se etanol kontinualno uklanja kao para (Verbelen i sar., 2006).

2.4.5. Prednosti primene imobilisanih ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji

U proizvodnji etanola, sistem sa imobilisanim ćelijama *S. cerevisiae* može biti upotrebljen u cilju poboljšanja karakteristika klasične kontinualne fermentacije ili konvencionalnog diskontinualnog (šaržnog) procesa povećanjem koncentracije ćelija po jedinici zapremine bioreaktora. Karakteristike ovakvih sistema su: kontinualne operacije sa odgovarajućom brzinom razblaženja, promene u fiziologiji ćelija kvasca, određene fizičko-hemijskim mikrokruženjem oko ćelija kvasca i smanjeni efekti inhibicije supstrata, proizvoda ili jednog i drugog. Kombinovani uticaji ovih osobina dovode do poboljšanja efikasnosti sistema sa imobilisanim ćelijama *S. cerevisiae* za proizvodnju etanola i rezultiraju povećanjem produktivnosti. Prednosti primene imobilisanih ćelija *S. cerevisiae* u alkoholnoj fermentaciji su brojne (Kourkoutas i sar., 2004):

- Produžena aktivnost i stabilnost biokatalizatora.
- Nosac za imobilizaciju može biti i zaštitni faktor protiv fizičkih i hemijskih uticaja temperature, pH, rastvarača pa i teških metala.
- Viša koncentracija ćelija mikroorganizama po jedinici zapremine bioreaktora, što dovodi do više volumetrijske produktivnosti i kraćeg perioda fermentacije, ostvaruje se efikasniji utrošak supstrata i viši prinos bioetanola.
- Mogućnost stabilnog kontinualnog izvođenja procesa,
- Viša otpornost kvasca na visoke koncentracije supstrata i inhibiciju proizvodima,
- Mogućnost izvođenja fermentacije na nižim temperaturama, što dovodi do poboljšanja kvaliteta gotovog proizvoda.
- Lakše izdvajanje etanola kao proizvoda bez neophodne primene separacije i filtracije fermentisane podloge, što smanjuje troškove za opremu i energiju.
- Regeneracija i ponovno korišćenje biokatalizatora u dužem vremenskom periodu u diskontinualnom procesu fermentacije, bez uklanjanja biokatalizatora iz bioreaktora.
- Smanjeni rizik od mikrobiološke kontaminacije usled visoke koncentracije ćelija i visoke fermentativne aktivnosti,
- Mogućnost upotrebe manjih bioreaktora sa jednostavnijim procesima i tako i manjim ukupnim troškovima.

Gore navedene prednosti su potvrđene u brojnim istraživanjima na polju primene imobilisanih ćelija kvasca za alkoholnu fermentaciju u tehnologiji etanola, vina, piva i drugih alkoholnih pića. Analizirajući i poredeći literaturne podatke može se zaključiti da su nosači prirodnog porekla uglavnom odgovarajuće čistoće (engl. food grade) i mogu se primeniti u proizvodnji pića bez skupih predtretmana, a nakon upotrebe se mogu lako reciklirati ili bezbedno odložiti. Nasuprot tome, neorganski i sintetički materijali kao što su plastika i polimeri zahtevaju dosta složenu pripremu čak i u slučaj kada su odgovarajuće čistoće (Kourkoutas i sar., 2004). U svakom slučaju, istraživanja na polju fiziologije i metaboličke aktivnosti imobilisanih ćelija kvasca, dizajna bioreaktora i bioprocasa, razvoj novih nosača za imobilizaciju i flokulentnih sojeva kvasca predstavljaju osnovni preduslov za primenu imobilisanih ćelijskih sistema u industrijskoj praksi.

Pored sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, za kontinualne fermentacione tehnologije koriste se još: *Zymomonas mobilis* umrežen u hidrogelu polivinil alkohola, *E. coli* imobilisana na poroznim staklenim perlama i termofilne anaerobne bakterije *Thermoanaerobacter BG11* imobilisane na zrnastim nosačima. Razvoj i testiranje novih materijala za mikrobiološku imobilizaciju ćelija i primena u kontinualnim procesima fermentacije je takođe veoma atraktivan pravac istraživanja. Novi materijali koji se primenjuju su: razni prirodni celulozni materijali, sintetički materijali kao mikroporozni kopolimeri divinil benzena ili magnetne čestice u namagnetisanim fluidizovanim bioreaktorima (Mussatto i sar., 2010).

Uprkos sporij primeni u industriji, naučna istraživanja u oblasti kontinualnog dobijanja bioetanola pomoću imobilisanih ćelija kvasca su prilično atraktivna. U poslednjih nekoliko godina sve više su zastupljeni kontinualni procesi dobijanja etanola na bazi lignoceluloznih sirovina. Kontinualne fermentacije bi trebale da smanje troškove detoksikacije hidrolizata, zbog detoksikacione sposobnosti ćelija kvasca, naročito pri velikim gustinama ćelija koja se može uspostaviti raznim tehnikama imobilizacije. Šta više, ovi procesi treba da omoguće bolje rukovanje čvrstim materijalima, koji predstavljaju značajan udeo u koncentrovanim hidrolizatima (Mussatto i sar., 2010).

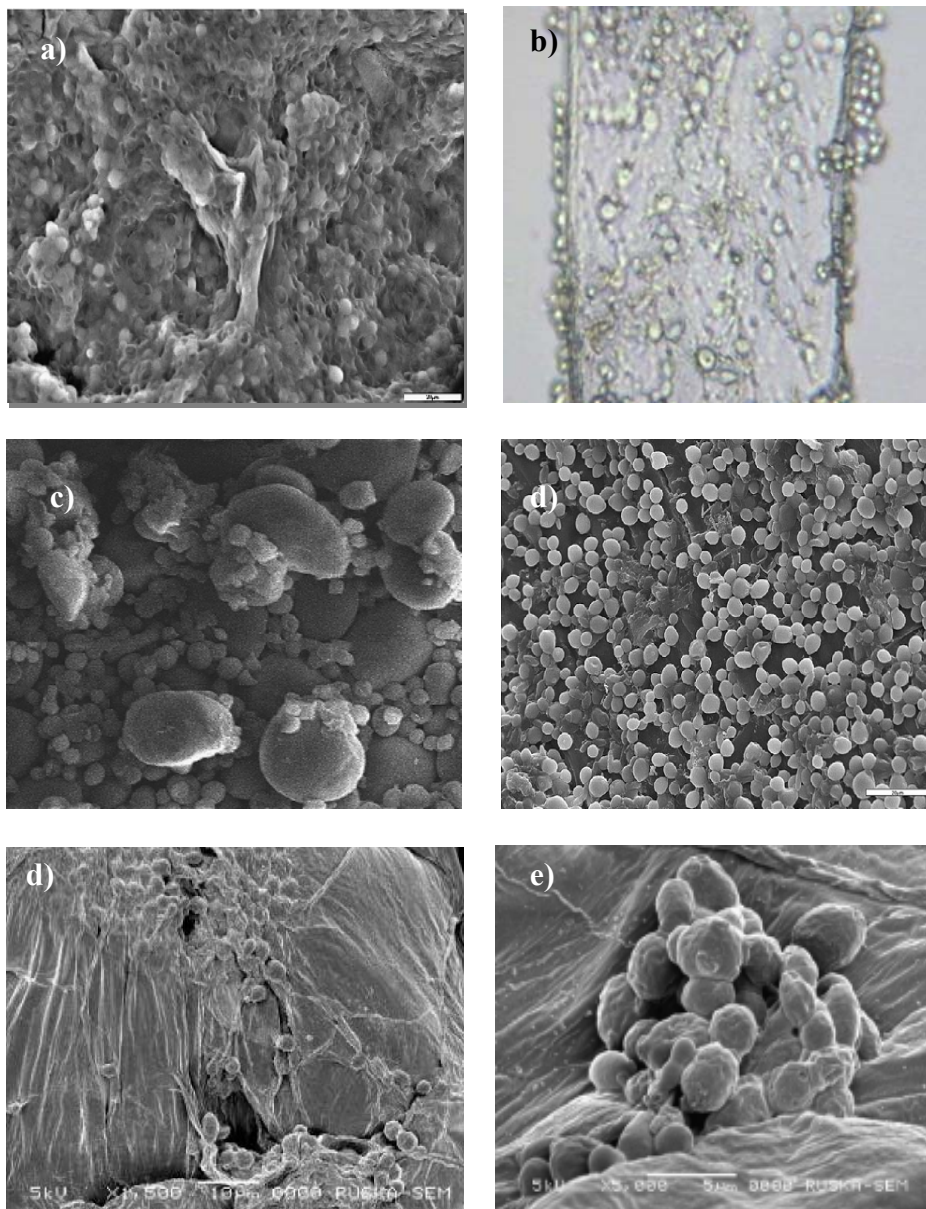
U cilju povećanja produktivnosti i ekonomske isplativosti postupka alkoholne fermentacije tokom poslednjih decenija je u naučnoj literaturi posvećena velika pažnja istraživanjima na polju primene imobilisanih ćelija kvasca kao biokatalizatora u kontinualnom postupku alkoholne fermentacije podloga sa visokim i veoma visokim sadržajem šećera (Laopaiboon i sar., 2009).

2.5. Biljni materijali kao nosači za imobilizaciju ćelija kvasca

Prirodna imobilizacija kvasca na površini nerastvornih nosača, čini se više prihvatljivom od drugih metoda imobilizacije, zbog činjenice da ne utiče značajno na rast ćelija kvasca, nosači se lako čiste, mikrobiološka kontaminacija može biti značajno smanjena ili u potpunosti sprečena, a pored toga deo ćelija kvasca može biti ispran iz sistema za fermentaciju i kontinualno obnovljen (Bai i sar., 2008). Za imobilizaciju ćelija kvasca površinskom adsorpcijom koriste se različiti prirodni i veštački materijali (Yu i sar., 2007). Industrijski nosač za imobilizaciju ćelija u fermentaciji etanola treba da bude jeftin, lako dostupan u dovoljnim količinama, stabilan, ponovno upotrebljiv, netoksičan i treba da omogući imobilizaciju velikog broja ćelija kvasca na nosaču sa minimalnim ograničenjima internog prenosa mase (Verbelen i sar., 2006). Površinske karakteristike nosača kao što su veličina pora, sadržaj vode, hidrofilnost i magnetizam su osnovni faktori koji utiču na ponašanje imobilisanih ćelija kvasca i njihovu produktivnost (Fujii, 1999). Zahvaljujući tome što zadovoljavaju gore navedene preduslove biljni materijali predstavljaju efikasne nosače za imobilizaciju ćelija *S. cerevisiae* u alkoholnoj fermentaciji. Iz navedenih razloga tendencija novih naučnih istraživanja na polju primene imobilisanih ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji bazira se na upotrebi različitih materijala biljnog porekla kao što su: lufa sunđer (Ogbonna i sar., 1994), opiljci drveta (Razmovski i Pejin, 1996), celulozni nosači (Fujii i sar., 1999), pokožica grožđa (Mallouchos i sar., 2002), osušene bobice groždica (Tsakiris i sar., 2004), stabla šećerne trske (Vasconcelos i sar., 2004), komadi guave (Reddy i sar., 2006), ljuska jabuke (Kourkoutas i sar., 2006), granule pšeničnog skroba (Farmakis i sar., 2007), ostaci prerade zrna žitarica (Kopsahelis i sar., 2007), ostaci prerade ječma (Mallouchos i sar., 2007), kora pomorandže (Plessas i sar., 2007), kora lubenice (Reddy i sar., 2008), ostaci prerade šećerne trske (Santos i sar., 2008), komadići šećerne trske (Liang i sar., 2008), divlja šećerna trska (Chandel i sar., 2009), ostaci prerade stabla slatkog sirka tzv. bagaza sirka (Yu i sar., 2007), ostaci proizvodnje vina i šapurike kukuruza (Genisheva i sar., 2010), biljni lufa sunđer (Behera i sar., 2011) i mnogi drugi.

Na slici 2.10. su prikazani mikroskopski snimci imobilisanih ćelija kvasca na različitim nosačima biljnog porekla. Prikazani mikroskopski snimci potvrđuju da ćelije *S. cerevisiae* imaju sklonost adsorpcije na površini različitih skrobnih i lignoceluloznih materijala biljnog porekla. U gore navedenim radovima je mikroskopskom analizom potvrđena imobilizacija ćelija kvasca na samoj površini nosača.

Na prikazanim mikroskopskim snimcima se može zapaziti da ćelije *S. cerevisiae* imaju sklonost da se vezuju za površinu različitih biljnih materijala, kao i da pojedine ćelije prodiru u sitne pore i otvore nosača. Na prikazanim snimcima se može uočiti pupanje ćelija kvasca, kao i ne ometani rast i razmnožavanje. U radovima gore navedenih autora je konstatovano da su imobilisane ćelije kvasca delom adsorbovane Van der Wals-ovim i jonskim interakcijama na samoj površini nosača, a delom vezane kapilarnim silama u šupljinama nosača.



Slika 2.10. Čelije *S. cerevisiae* imobilisane na a) kori pomorandže (Plessas i sar., 2007), b) ostacima prerade šećerne trske (Santos i sar., 2008), c) granulama pšeničnog skroba (Farmakis i sar., 2007), d) ostacima prerade zrna žitarica (Kopsahelis i sar., 2007), e) komadima guave (Reddy i sar., 2006), f) kori lubenice (Reddy i sar., 2008).

Čelije *S. cerevisiae* imobilisane na različitim nerastvornim nosačima su u dosadašnjim istraživanjima primenjivane za diskontinualnu ili kontinualnu alkoholnu fermentaciju različitih supstrata. U tabeli 2.5. su prikazani parametri fermentacije različitih supstrata ostvareni primenom ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na različitim nerastvornim nosačima pri temperaturi fermentacije 30 °C koji se navode u odgovarajućoj literaturi.

Tabela 2.5. Parametri diskontinualne fermentacije (srednje vrednosti) ostvareni primenom *S. cerevisiae* imobilisanih na različitim nosačima biljnog porekla pri temperaturi fermentacije 30° C.

Nosač	Supstrat	Početni sadržaj šećera S_o (g/l)	Vreme fermentacije t (h)	Preostali šećer S_r (g/l)	Etanol P (g/l)	Produktivnost etanola Q_p (g/lh)	Konverzija šećera Y_s (%)
Delignifikovan celulozni materijal (Iconomou i sar., 1995)	Melasa/saharoza	172	36	10,2	104	2,89	94
	Glukoza	350	67	68,0	144	2,15	80,5
Glutenske kuglice (Bardi i sar.,1996)	Glukoza	119	15	12,5	39,5	2,63	89,5
	Groždana šira	206	17	18,9	83,7	4,92	90,1
Suve smokve (Bekatorou i sar., 2002)	Surutka	129	18	0,0	47,4	2,67	100
	Glukoza	120	45	1,4	45	1,00	98
Komadi jabuke (Kourkoutas i sar., 2001)	Groždana šira	206	80	30,8	85	1,08	85,0
Komadi dunje (Kourkoutas i sar., 2003)	Groždana šira	185	28	0,1	84	3,00	99,9
Kora narandže (Plessas i sar., 2007)	Glukoza	125	9	4,0	51,4	5,35	96,8
	Melasa/saharoza	128	14	2,0	58,9	4,17	98,4
	Ekstrakt suvog grožđa	124	12	2,3	55,3	4,60	98,1
Kora lubenice (Reddy i sar., 2008)	Groždana šira	202	64	tr	87,0	0,08	100
Stablo šećerne trske (Liang i sar., 2008)	Melasa šećerne trske	154	27	2,3	77,13	2,62	98,94
	Sok šećerne trske	174	32	0,9	89,73	2,48	99,49

Analizirajući parametre fermentacije prikazane u tabeli 2.5. može se zaključiti da kvasac imobilisan na različitim biljnim materijalima predstavlja efikasan biokatalizator za fermentaciju različitih supstrata. Takođe se može zapaziti da trajanje fermentacije zavisi od prirode sirovine i količine šećera u podlozi za fermentaciju. U većini prikazanih postupaka fermentacije, imobilisane ćelije kvasca su usvojile gotovo sav prisutan šećer pri čemu su postignute koncentracije etanola od 39,5 g/l do 144 g/l, dok je ostvarena produktivnost etanola bila u opsegu od 0,88 g/lh do 5,35 g/lh. Analizirajući podatke prikazane u tabeli 2.5. može se zapaziti da se kao sirovine za alkoholnu fermentaciju pomoću ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na biljnim materijalima uglavnom koriste voćni sokovi, surutka ili melasa, koje za razliku od hidrolizata skrobnih sirovina ne sadrže grubo suspendovane čestice, koje bi mogle oštetiti nosač ili doprineti ispiranju ćelija kvasca sa nosača. Takođe se može uočiti da se kao nosači za imobilizaciju često koriste lignocelulozni biljni materijali koji predstavljaju agroindustrijske nusproizvode. Proizvodnja etanola je usko povezana sa poljoprivredom, pa stoga postoji težnja da se na što efikasniji način eksploatišu raspoloživi poljoprivredni resursi uz što manja ulaganja.

Rezanci šećerne repe i parenhimsko tkivo stabla kukuruza su obnovljivi, biljni, lignocelulozni materijali visoke poroznosti koji su u Srbiji, a naročito Vojvodini lako dostupni u velikim količinama. Pri tome, u slučaju kombinovane tehnologije proizvodnje šećera i etanola rezanci šećerne repe se već nalaze u krugu fabrike, pa nisu potrebna ulaganja za dopremanje ovog nosača za imobilizaciju ćelija kvasca. Gore navedeni biljni lignocelulozni nosači za imobilizaciju ćelija kvasca (kora pomorandže, komadi dunje i jabuke, drveni opiljci, šećerna trska itd.) su u velikoj meri sačinjeni od parenhimskih biljnih ćelija i po hemijskom sastavu i strukturi veoma slični rezancima šećerne repe i parenhimskom tkivu stabla kukuruza, pa se može pretpostaviti da i ovi materijali takođe imaju sklonosti ka imobilizaciji ćelija kvasca. Sve ove činjenice predstavljaju dovoljan razlog da se ispituju karakteristike i potencijal primene rezanaca šećerne repe i parenhimskog tkiva stabla kukuruza kao nosača za imobilizaciju ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji.

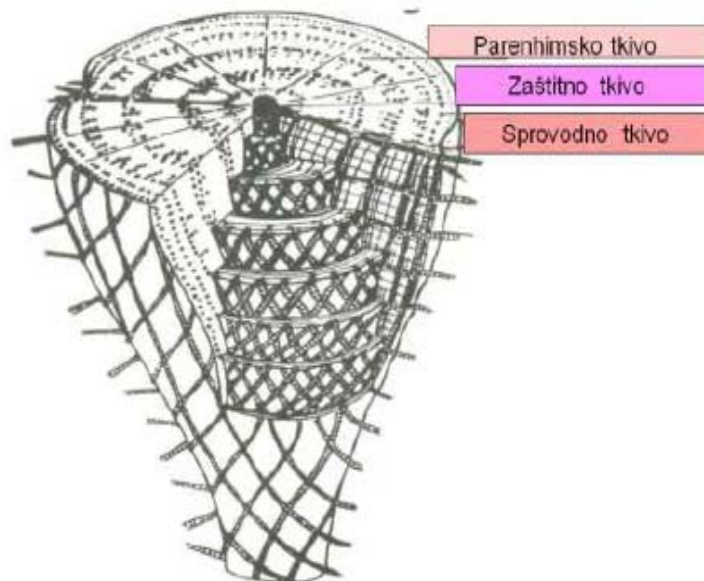
2.5.1. Rezanci šećerne repe (RŠR), struktura i hemijski sastav

Rezanci šećerne repe (RŠR) predstavljaju obnovljiv i veoma jeftin (100 US\$ po metričkoj toni) lignocelulozni materijal koji preostaje kao nusproizvod procesa proizvodnje konzumnog šećera nakon ekstrakcije šećera iz šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) (Panagiotopoulos i sar., 2010). Rezanci šećerne repe su po svojoj strukturi složena koloidno-kapilarna tela, a sastav i struktura su im uslovljeni pre svega kvalitetom, sortom i uslovima gajenja šećerne repe (Petrov, 1980).

Hemijski sastav šećerne repe može da varira u zavisnosti od uslova kao što su: sorta šećerne repe, sastav zemljišta, uslovi vegetacije, sastava i pripreme zemljišta, upotrebe đubriva i slično. Repa približno sadrži 75% vode i 25% suve mase. Veći deo vode, oko 72,1%, nalazi se u vakuolama repinih ćelija. U njoj su rastvorene organske i mineralne

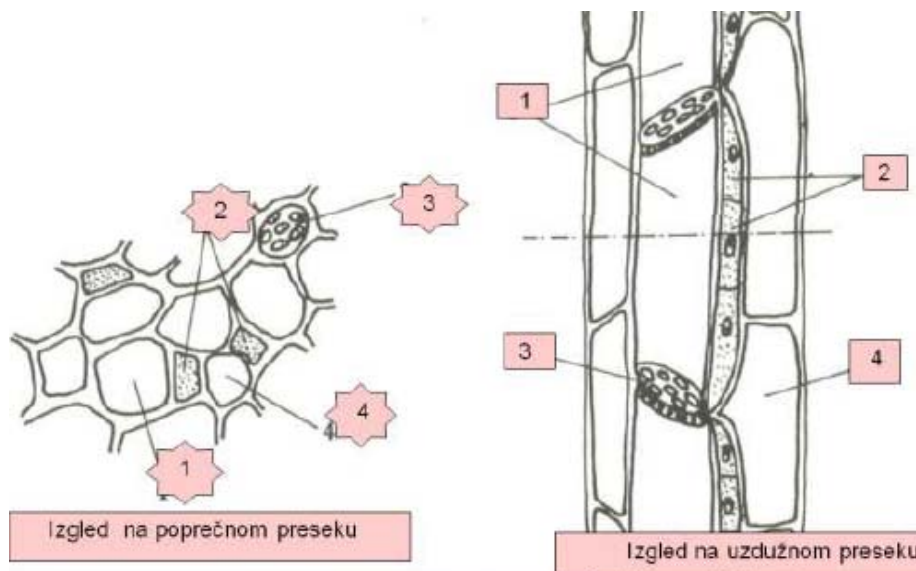
materije, što čini normalni sok repe. Manja količina vode, oko 2,9% ne ulazi u sastav soka, jer je vezana u srži repe i naziva se vezana voda. Od ukupne količine suve mase šećerne repe, na saharozu otpada 17,5%, dok 7,5% čini suva masa ostalih jedinjenja koja se nazivaju nešećeri. Deo nešećera (2,5% na sirovu repu), rastvoren je i zajedno sa vodom i saharozom ulazi u sastav normalnog soka, dok nerastvornih šećera ima 5% na sirovu repu i čine srž repe (Šušić i sar., 1994).

Koren šećerne repe je izgrađen od različitih tkiva koja se mogu uočiti na horizontalnom preseku repe u vidu tamnijih i svetlijih koncentričnih krugova kao što je prikazano na slici 2.11. Zaštitno tkivo (periderm) je sačinjeno od sloja ćelija koje su odrvenele. Služi za zaštitu od mehaničkih povreda, prodiranja mikroorganizama, gubitka vode usled isparenja i prodiranja vode u koren. Parenhimsko tkivo stvaraju parenhimske ćelije, koje se nalaze ispod periderma i prožimaju ceo koren. Parenhimske ćelije su uglavnom sakupljene u koncentrične krugove svetlije nijanse i služe za deponovanje hranljivih materija. Sprovodno tkivo predstavlja snopiće sudova raspoređenih u 10 do 12 tamnijih koncentričnih krugova i služi za transport hranljivih materija kroz biljku.



Slika 2.11. Struktura korena šećerne repe (Petrov, 1980)

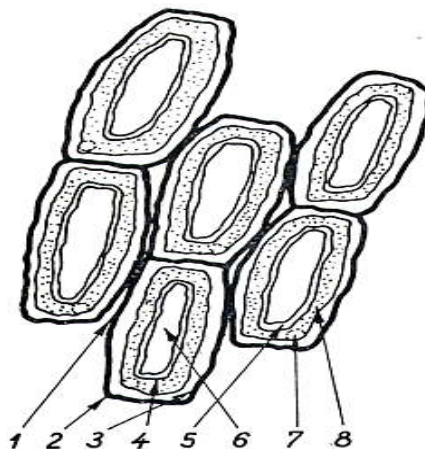
Sprovodno tkivo je izgrađeno od floemskog i ksilemskog tkiva, kao što je prikazano na slici 2.12. (Petrov, 1980). Floemsko tkivo je izgrađeno iz većih sitastih sprovodnih ćelija i manjih sprovodnih ćelija. Služi za transport organskih materija. Ksilemsko tkivo je sastavljeno od sprovodnih kanala-traheja. Služi za transport vode i neorganskih materija. Obe vrste sprovodnog tkiva čine jedinstven transportni sistem kojim je protkana cela biljka.



Slika 2.12. Floemsko i parenhimsko tkivo u korenu šećerne repe.

1-sitaste sprovodne ćelije, 2-manje sprovodne ćelije, 3-sitaste pločice, 4-parenhimske ćelije (Petrov, 1980).

Sa tehnološke tačke gledišta najveći značaj imaju parenhimske ćelije, koje čine 75% svih ćelija šećerne repe, i u njima se nalazi pretežan deo šećera. Parenhimske ćelije su većih dimenzija od ostalih i njihov prečnik iznosi oko 40 μm . U 1 cm^3 tkiva nalazi se oko 16 miliona ćelija čija je struktura prikazana na slici 2.13.



Slika 2.13. Struktura parenhimskih ćelija šećerne repe; 1-međućelijski prostor, 2-srednja lamela, 3-primarni ćelijski zid, 4-citoplazma, 5-membrana plazme, 6-vakuola, 7-ćelijsko jedro, 8-mikrozomi (Petrov, 1980).

U Evropskoj Uniji se godišnje proizvede oko 14 miliona tona suve mase rezanaca šećerne repe (Altundogan i sar., 2007). Rezanci šećerne repe sadrže 75%–80% polisaharida, oko 22–24% celuloznih mikrovlakana, 30% hemiceluloze uglavnom arabinana i (arabino) galaktana i 25% metilovanih i acetilovanih pektina računato na suhu masu. Zahvaljujući

visokom sadržaju digestivnih vlakana rezanci šećerne repe predstavljaju odličan visokoenergetski dodatak stočnoj hrani. Rezanci šećerne repe su efikasan supstrat za kompleksaciju katjona, predstavljaju izvor poliola za proizvodnju uretana i poliuretana i izvor vlakana za proizvodnju biodegradibilnih kompozitnih materijala ili papira (Rouilly i sar., 2009).

Rezanci šećerne repe predstavljaju vlaknasti ostatak korena repe koji se dobija u procesu proizvodnje konzumnog šećera nakon faze ekstrakcije saharoze iz repe toplom vodom. U zavisnosti od načina prerade razlikuju se ekstrahovani (ERŠR), presovani (PRŠR), suvi (SRŠR) i melasirani rezanci šećerne repe (MRŠR). Na slici 2.14. je prikazana šema uobičajenog postupka prerade rezanaca šećerne repe.



Slika 2.14. Šema postupka prerade rezanaca šećerne repe (RŠR) (Petrov, 1980)

Nakon ekstrakcije šećera u difuzionim baterijama kao sporedni proizvod preostaju ekstrahovani rezanci šećerne repe (ERŠR) sa sadržajem suve mase 8-11% m/m. U cilju smanjenja sadržaja vlage ekstrahovani rezanci se dalje presuju. Presovani rezanci šećerne repe (PRŠR) sadrže 14-30% m/m suve mase, što zavisi od kapaciteta samih presa kao i od kvaliteta sirovine. Nezrela repa sadrži veliku količinu lako bubrećih pektina, koji kao izrazito hidrofилni koloidi vezuju veliku količinu vode. Prilikom prerade nezrelih rezanaca voda se otežano izdvaja na presama, pa je samim tim otežano i dobijanje rezanaca sa

potrebni sadržajem suve mase. Nakon presovanja deo soka koji je preostao u izluženim rezancima se vraća u proces kao voda od presovanja. Presovani rezanci su zbog visokog sadržaja vode podložni brzom kvarenju i moraju se odmah koristiti kao stočna hrana. Pošto fabrike šećera imaju velike kapacitete dnevne prerade repe, često nije moguće odmah iskoristiti tako veliku količinu presovanih rezanaca za ishranu stoke, nego se najveći njihov deo skladišti. Da bi se mogli koristiti kao stočna hrana rezanci se moraju konzervirati siliranjem bez ili sa dodatkom drugih hraniva. Siliranjem, rezanci se podvrgavaju vrenju pri čemu gube oko 40% hranjive vrednosti. Za dugotrajno čuvanje, presovani rezanci se moraju sušiti, pri čemu se dobijaju suvi rezanci šećerne repe (SRŠR). Pri sušenju smanjuje se masa rezanaca oko 4-5 puta, dok gubici hranljivih materija iznose oko 10-12%. Prema tome, transport suve materije u osušanim rezancima znatno je jeftiniji, gubitak na hranljivoj vrednosti vrlo je mali, a suvi rezanci mogu, za razliku od izluženih rezanaca, da se skladište u suvim magacinima na neograničeno vreme. Osušeni rezanci se mogu čuvati u rasutom stanju gotovo neograničeno dugo ili presovati u željeni oblik pogodan za transport. Sušeni rezanci sadrže 2-5% šećera i samo 10-12% vode. Osim suvih rezanaca mogu se proizvoditi i melasirani suvi rezanci ako se presovanim rezancima pre sušenja doda 30-35% melase u odnosu na količinu suvih rezanaca. Melasirani suvi rezanci (MRŠR) imaju oko 18-22% šećera koji se nalazi na površini rezanaca i delimično je karamelizovan (Šušić i sar., 1994). Prosečan hemijski sastav suve mase ekstrahovanih rezanaca šećerne repe dat je u tabeli 2.6.

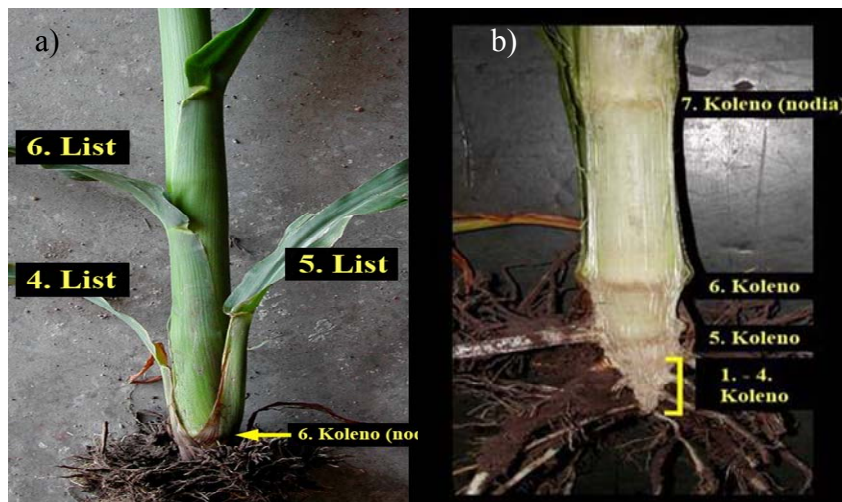
Tabela 2.6. Hemijski sastav ekstrahovanih rezanaca šećerne repe (Jokić i sar., 2005).

Hemijske komponente	(% s.m.)
Hemiceluloza (uglavnom araban)	26,0
Pektin	24,0
Celuloza	23,0
Proteini (po Kjeldahl-u N×6.25)	9,0
Saharoza	6,0
Lignin	4,5
Rastvorljive mineralne materije	4,0
Nerastvorljive mineralne materije	3,0
Masti	0,5

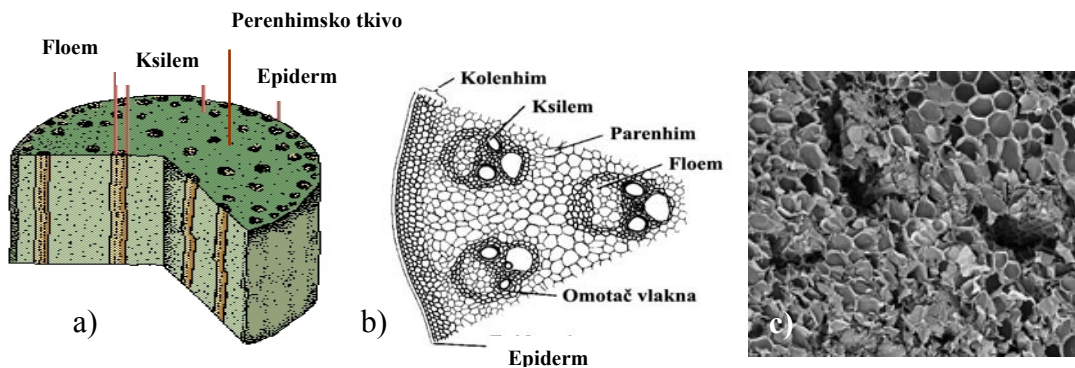
Suva masa rezanaca sadrži 65-80% polisaharida, od toga oko 40% celuloze, 30% hemiceluloze i 30% pektina (Jokić i sar., 2005). U rezancima šećerne repe preostane oko 0,5% šećera, računato na šećer iz repe, a sadržaj suve mase ekstrahovanih odnosno izluženih rezanaca iznosi oko 6%. U rezancima šećerne repe nakon prerade preostaje najveći deo pektinskih materija šećerne repe u obliku protopektina. Oko 70% proteina koji se nalaze u unutrašnjim ćelijama šećerne repe se tokom ekstrakcije koagulišu i ostaju u izluženim rezancima.

2.5.2. Parenhimsko tkivo stabla kukuruza (PTSK), struktura i hemijski sastav

Stablo kukuruza (Slika 2.15.), je jeftin široko rasprostranjen i lako dostupan lignocelulozni materijal u mnogim regionima sveta (Thamae i sar., 2008). Stabla kukuruza se koriste kao stočna hrana za preživare, izvor vlakana u proizvodnji pulpe za papir i kao celulozna sirovina za proizvodnju bioetanola (Beltron-Garcia i sar., 2001). Stabla kukuruza koja ostaju u polju posle berbe sadrže 43% polisaharida koji se sastoji uglavnom od celuloze i hemiceluloze, 29% lignina, 7% proteina, 5% pepela i 16% ostalih sastojaka (Beltron-Garcia i sar., 2001). Heterogena struktura stabla kukuruza prikazana je na slici 2.16. Spoljni omotač (kolenhim) se sastoji od čvrstih lignoceluloznih vlakana spojenih pektinom i ligninom. Jezgro stabla uglavnom čini parenhimsko tkivo celulozne prirode sa mikrostrukturom parenhimskih ćelija u obliku pčeljinjeg saća dok se na poprečnom preseku mogu uočiti snopovi vaskularnog, odnosno sprovodnog tkiva (Thamae i sar., 2008, Battacharya i sar. 2006).



Slika 2.15. Stablo kukuruza a), i uzdužni presek stabla kukuruza b).



Slika 2.16. Stablo kukuruza (monokotiledon *Zea mays*): a) struktura isečka, b) porečni presek, c) mikroskopski snimak poprečnog preseka.

2.6. Ca-alginat kao nosač za imobilizaciju ćelija kvasca

Imobilizacija ćelija kvasca u matrici Ca-alginata predstavlja najrasprostranjeniji i najviše proučavan postupak imobilizacije širokog spektra živih ćelija (bakterija, kvasaca, plesni, algi, biljnih i životinjskih ćelija). Ca-alginat je takođe najčešće primenjivani nosač za imobilizaciju kvasaca (*S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*) u alkoholnoj fermentaciji (Nedović 1999, Zhaoxin i sar. 2002; Phisalophon i sar., 2007; Yu i sar., 2007).

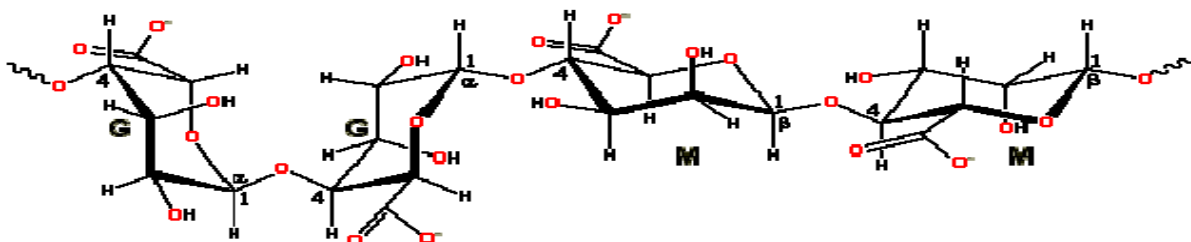
2.6.1. Struktura i hemijski sastav Ca-alginata

Postupak imobilizacije ćelija kvasca se sastoji u sledećem: u rastvor Na-alginata se suspenduje kvasac, a zatim se suspenzija ukapava u rastvor CaCl_2 . Pri tome nastaju kuglice Ca-alginata unutar kojih se nalaze imobilisane ćelije kvasca (Kourkoutas i sar., 2004).

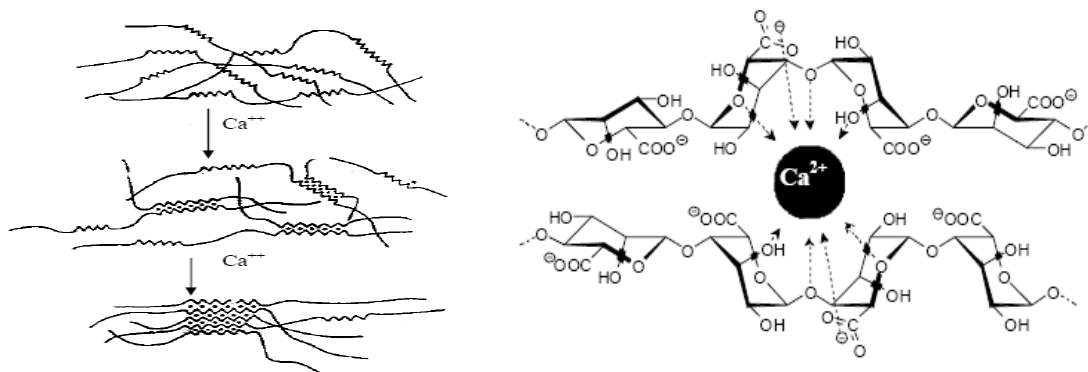
Alginati su amonijumove i metalne soli alginske kiseline, za koje je karakteristično da formiraju gelove u prisustvu dvovalentnih katjona. Dobijaju se iz morskih trava i algi (*Laminariales*, *Fucales*). Alginska kiselina je prirodni hidrofilni koloidni polisaharid, dobijen iz različitih velikih smeđih algi (*Phaeophycota*) gde se nalazi kao sastavni deo ćelijskog zida. To je linearni kopolimer D-manuronske kiseline povezane β -1,4 vezama (M segmenti) i L-guluronske kiseline povezane α -1,4 vezama (G segmenti) (slike 2.17. i 2.18.). Sastav alginskih kiselina varira od izvora do izvora, čak i unutar različitih delova istog organizma. Komercijalno je dostupno dosta različitih alginatnih kiselina koje variraju po komponentama i molekulskim masama (Nedović, 1999).

Soli jednovalentnih katjona lako se rastvaraju u hladnoj vodi, dajući viskozne rastvore pri niskim koncentracijama (Na-alginat), a soli dvovalentnih katjona su nerastvorljive u vodi jer stvaraju nerastvorljive komplekse. Između Ca^{2+} jona i karboksilne grupe alginske kiseline nastaje koordinativna veza. Pri tom nastaje trodimenzionalna mreža sastavljena od dugih lanaca M-segmenata i čvorišta nastalih između kalcijuma i G-segmenata alginske kiseline. Mehanizam obrazovanja gela zavisi od strukture i sastava sekvenci, to jest redosleda vezivanja guluronske i manuronske kiseline (Nedović, 1999). Ovde se ispoljava osobina alginske kiseline za imobilizaciju ćelija kvasca, odnosno jačina formiranog gela. Formiranje polimerne mreže se izvodi povezivanjem jona kalcijuma sa jedinicama guluronske kiseline (pogotovo one gde je prisutno više od 20 monomera guluronske kiseline), pri čemu se obrazuje šupljina u kojoj se Ca^{2+} joni vezuju za lanac polimera (Slika 2.18.). Veze formirane između ovih mesta i sličnih sekvenci u drugim polimernim lancima obrazuju čvorna mesta u matrici gela (Slika 2.18.). Za smeštanje ćelija u matricu polimera su bolje alginske kiseline sa većim sadržajem guluronske kiseline, ali ako se traže neke druge osobine kao veličina onda ne dolaze u obzir ovakvi molekuli alginske kiseline. *Laminaria* vrste algi daju veći sadržaj guluronske kiseline, dok su *Macrocystis* i *Ascophyllum* vrste više bogate segmentima manuronske kiseline (Horn, 2000).

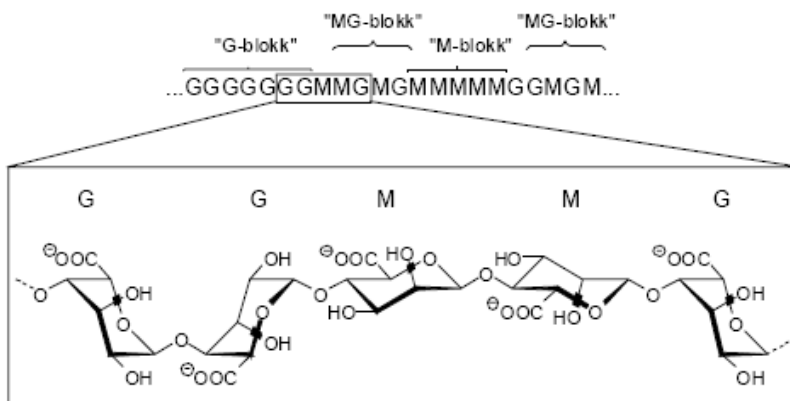
Strukturna formula Ca-alginata je prikazana na slici 2.19. Monomeri su povezani u homopolimerne blokove odvojene područjima sa alternirajućim sekvencama oba kisela monomera. Udeo monomera zavisi od vrste alge. Monomeri su raspoređeni kao homogeni blokovi (GG ili MM) ili kao naizmenične sekvence (Slika 2.19.).



Slika 2.17. Strukturna formula algininske kiseline (Horn, 2000).



Slika 2.18. Vezivanje jona kalcijuma za ostatke guluronske kiseline (Horn, 2000).

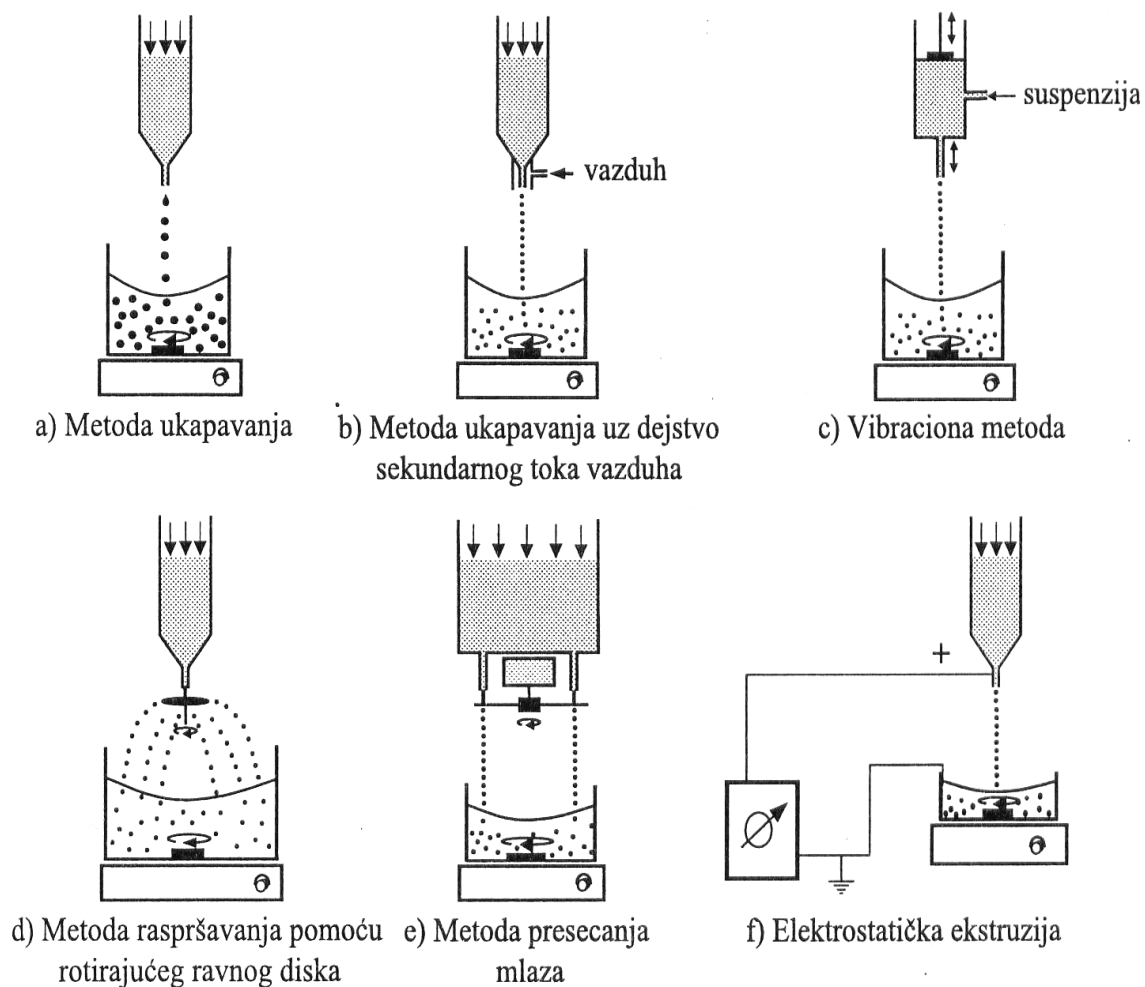


Slika 2.19. Šematski prikaz alginatnog bloka (Horn, 2000).

2.6.2. Postupci imobilizacije ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata

Poslednjih decenija je razvijeno više različitih ekstruzionih postupaka za imobilizaciju ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata koje su prikazane na slici 2.20. (Nedović, 1999):

- a) *Metoda ukapavanja* je najjednostavnija metoda koja se često izvodi u laboratorijskim uslovima, a sastoji se u potiskivanju suspenzije ćelija i polimera kroz iglu određenog prečnika, sa čijeg vrha se pod uticajem gravitacione sile odvajaju kapljice suspenzije i padaju u rastvor gde dolazi do želiranja i nastajanja čestica gela. Nedostatak ove metode je mali kapacitet proizvodnje i velik prečnik dobijenih kuglica (2-3 mm).
- b) *Metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha* podrazumeva uvođenje sekundarnog toka vazduha u nivo otvora igle u sistem za ukapavanje suspenzije je omogućeno dobijanje čestica manjih dimenzija (0,2-3 mm).
- c) *Vibraciona metoda* se zasniva na principu izazivanja vibracija kapilare (mlaznice) kroz koju se velikom brzinom propušta suspenzija polimera i ćelija kvasca u vidu mlaza i formiranja segmenata (kapljica) ujednačenih veličina (prečnika oko 1 mm).
- d) *Metoda raspršivanja (atomizacije)* pomoću rotirajućeg ravnog diska omogućuje primenu izuzetno viskoznih suspenzija i daje uniformnu raspodelu čestica. Ovde se suspenzija polimera i ćelija putem šuplje cevi dovodi na površinu diska koji rotira velikom brzinom, usled čega se suspenzija raspršuje u sitne kapi i pada u rastvor za želiranje.
- e) *Metoda presecanja mlaza* gde se dobijanje čestica (prečnika manjeg od 1 mm) postiže presecanjem mlaza suspenzije, koji protiče iz mlaznice, pomoću žice koja rotira velikom brzinom pri čemu se prvo formiraju segmenti cilindričnog oblika koji zatim dobijaju oblik sfernih čestica na putu ka rastvoru za želiranje.
- f) *Elektrostatička ekstruzija* se primenjuje u poslednje vreme, a podrazumeva ekstruziju suspenzije polimera kroz kapilaru ili iglu uz primenu elektrostatičkog polja između vrha igle (pozitivnog naboja) i rastvora za želiranje. Omogućava dobijanje izuzetno sitnih čestica (prečnika manjeg od 150 μm) uniformnog oblika.



Slika 2.20. Ekstruzioni postupci umrežavanja biokatalizatora u Ca-alginatu (Nedović, 1999).

2.6.3. Karakteristike alginatnih kuglica

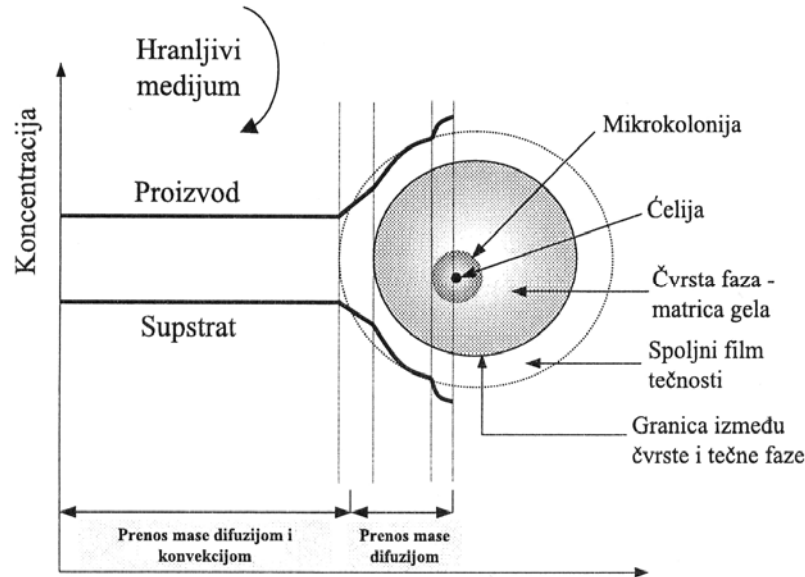
Na sferičnost i veličinu alginatnih kuglica u najvećoj meri utiče primenjena tehnika dobijanja, viskozitet rastvora Na-alginata i rastojanje između vrha igle (kapilare) i površine rastvora koji se koristi za prihvatanje kapljica (CaCl_2). Veličine alginatnih kuglica se najčešće kreću u rasponu od 200 μm do 3 mm. Mehanička otpornost kuglica gela zavisi od sastava alginata, strukture i veličine molekula alginata. Veliku mehaničku otpornost su pokazale alginatne čestice kod kojih je sadržaj α -L-guluronske kiseline viši od 70% i kod kojih je srednja dužina GG segmenata oko 15 jedinica monomera. Jedan od nedostataka alginata kao nosača predstavlja hemijska nestabilnost u prisustvu jedinjenja koja formiraju helatne komplekse (fosfati, citrati, laktati, joni Na i Mg). Difuzione karakteristike alginatnih čestica, veličina pora i njihova raspodela su presudni za odigravanje određenih biohemijskih reakcija. Brzina difuzije prvenstveno zavisi od veličine pora i koncentracije Na(Ca)-alginata. Sa porastom koncentracije alginata dolazi do opadanja koeficijenta difuzije usled toga što matrica polimera smanjuje raspoloživu zapreminu (površinu) za odvijanje difuzije (efekat "isključenja") kao i usled prisustva delova molekula polimera koji su nepropusni (Nedović, 1999).

Difuzija supstrata i produkata kroz matricu Ca-alginata u kojoj se nalaze imobilisane ćelije kvasca je veoma složen proces. U zavisnosti od odnosa brzine difuzije hranljivih komponenti iz medijuma i brzine njihove asimilacije od strane imobilisanih ćelija kvasca mogu se nastati sledeće dve situacije:

- a) Ukoliko je brzina usvajanja supstrata od strane imobilisanih ćelija kvasca veća od brzine difuzije supstrata oko ćelija dolazi do stvaranja zone osiromašene hranljivim materijama pa će proces biti kontrolisan brzinom transporta hranljivih materija.
- b) Ukoliko je brzina transporta hranljivih materija veća od brzine asimilacije istih od strane imobilisanih ćelija kvasca onda će proces zavisiti od brzine enzimske reakcije pa je takav proces zapravo kinetički kontrolisan proces.

Pri definisanju uticaja prenosa mase kroz polimer na krajnju brzinu procesa najčešće se koriste bezdimenzioni faktor efikasnosti η i *Thiele* modul Φ . Faktor efikasnosti predstavlja odnos brzine reakcije u konkretnom slučaju i brzine iste reakcije kada ne postoji otpor difuziji, dok *Thiele* modul predstavlja odnos brzine utroška supstrata i brzine njegovog transporta difuzijom. Na osnovu vrednosti ovih bezdimenzionih faktora može se zaključiti da li je sistem kontrolisan prenosom mase ili kinetikom reakcije.

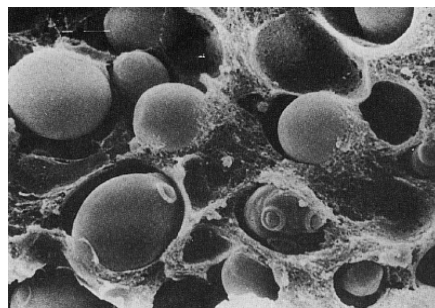
Proces prenosa supstrata iz hranljivog medijuma do jedne imobilisane ćelije u kuglici Ca-alginata, i proizvoda metabolizma od ćelije ka medijumu (Slika 2.21.) podrazumeva spoljni i unutrašnji prenos mase.



Slika 2.21. Prenos mase supstrata iz hranjive podloge do imobilisane ćelije i proizvoda od ćelije ka podlozi (Nedović, 1999).

Spoljni prenos mase predstavlja prenos supstrata do površine nosača. Najveći otpor prenosu supstrata predstavlja laminarni sloj tečnosti u neposrednoj blizini granice faza tečno-čvrsto. Tip bioreaktora, njegova veličina i operativni uslovi imaju važnu ulogu u smanjenju ovog otpora (otpor se smanjuje mešanjem). Unutrašnji prenos mase predstavlja transport supstrata ili proizvoda unutar nosača. U dosadašnjim istraživanjima je uočeno da se ćelije uglavnom koncentrišu u perifernim slojevima čestica usled nedostatka supstrata u centralnim slojevima i postojanja odgovarajućeg gradijenta koncentracije. Unutrašnji prenos mase se može optimizovati podešavanjem veličine, teksture i poroznosti matrice Ca-alginata (Nedović, 1999).

Umrežavanjem u matrici Ca-alginata rast ćelija *S. cerevisiae* može biti ugrožen jer su pojedine ćelije mehanički ograničene usled prisustva guste mreže polimera. Na slici 2.22. prikazane su ćelije kvasca imobilisane u Ca-alginatu od kojih su neke fizički ograničene, dok pojedine imaju dovoljno prostora za formiranje novih ćelija (Madden, 1995).



Slika 2.22. Ćelije kvasca umrežene u matriksu Ca-alginata (Madden, 1995).

Alginati su zahvaljujući malim količinama polifenolnih materija vrlo fluorescentni. Kontaminanti se otkrivaju fluorescentnom spektroskopijom u koncentracijama nižim od 1 ppm. Čak i nizak nivo kontaminacije alginata može biti problem u vođenju procesa pa je neophodno potpuno osloboditi alginata od kontaminanata. Da bi se umanjila kontaminacija fenolima tkivo algi se prethodno tretira formaldehidom koji čini fenole nerastvorljivim, pretvarajući ih u fenolformaldehidne smole (Nedović, 1999).

2.6.4. Fermentacija pomoću ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata

Ćelije kvasca imobilisane u Ca-alginatu se mogu uspešno primeniti za alkoholnu fermentaciju različitih supstrata kao što su glukoza, fruktoza, saharoza i maltoza (Behera i sar., 2010; Buzás i sar., 1989; Lee i sar., 2011; Ghorbani i sar., 2011), hidrolizat kukuruza za proizvodnju bioetanola (Nikolić i sar., 2009; Nikolić i sar. 2009a; Nikolić i sar., 2009b), groždani sok za proizvodnju vina (Bakoyianis i sar., 1997), sladovina za proizvodnju piva (Nedović, 1999), lignocelulozni hidrolizati (Branberg i sar., 2007) i mnogi drugi.

McGee i sar. (1982) su višestruko koristili ćelije *S. cerevisiae* imobilisane u kuglicama Ca-alginata u ponovljenim diskontinualnim postupcima fermentacije kao i u kontinualnom postupku fermentacije glukoze (10% m/m). Autori su istakli da je tokom 12 dana ponovljenih diskontinualnih fermentacija pomoću imobilisanog biokatalizatora u kuglicama Ca-alginata ostvareno 100%-tno iskorišćenje glukoze, dok je u kontinualnom postupku 100%-tno iskorišćenje glukoze ostvareno u trajanju od čak tri meseca.

Lee i sar. (2011) su takođe za višestepenu diskontinualnu fermentaciju 10% rastvora glukoze koristili ćelije *S. cerevisiae* imobilisane na kuglicama Ca-alginata i došli do zaključka da se povećanjem broja ponovljenih ciklusa fermentacije, usled umnožavanja ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata, povećava koncentracija etanola i skraćuje vreme fermentacije.

Buzás i sar. (1989) su ispitivali uticaj pH vrednosti glukozne podloge na fermentacionu sposobnost ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih u kuglicama Ca-alginata i došli do zaključka da su imobilisane ćelije u kuglicama Ca-alginata zaštićene od spoljašnjih uticaja iz podloge i stoga su neosetljive na promene pH vrednosti u podlozi. Zahvaljujući zaštitnom dejstvu Ca-alginata imobilisane ćelije kvasca se mogu koristiti za fermentaciju različitih podloga (melasa, voćni sokovi ili slatki sirak) bez prethodnog podešavanja pH vrednosti i bez precizne regulacije vrednosti pH tokom fermentacije (Buzás i sar., 1989).

U radu Nikolić i sar (2009b) je utvrđeno da su ćelije kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* imobilisane elektrostatičkom ekstrudijom u kuglicama Ca-alginata, tokom fermentacije hidrolizata kukuruza tolerantnije na inhibiciju supstratom i na toksični efekat etanola od slobodnih ćelija. U ovom radu je, takođe, utvrđeno da je optimalna količina inokuluma za ovu fermentaciju 2% m/m, optimalno vreme fermentacije 38 h, a optimalna početna koncentracija glukoze u hidrolizatu 150 g/l.

Dodatkom odgovarajuće smeše vitamina i minerala (2 g/l MgSO₄, 0,3 g/l ZnSO₄, 1 mg/l CuCl₂, 1 mg/l Ca-pantotenata, 1 mg/mg inozitola) u enzimski hidrolizat kukurza, za 20% se povećava efikasnost fermentacije pomoću ćelija *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* imobilisanim elektrostatičkom ekstrudijom u kuglicama Ca-alginata, u odnosu na postupak fermentacije bez dodataka (Nikolić 2009).

Ćelije *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* imobilisane elektrostatičkom ekstrudijom u kuglicama Ca-alginata se mogu koristiti u postupku simultanog enzimskog oštećenja skroba i fermentacije kukuruznog brašna, pri čemu se uz dodatak mineralnih soli ostvaruje superioran fermentacioni sistem u odnosu na konvencionalni sistem koji podrazumeva odvojeni postupak oštećenja i fermentacije. U ovom radu ostvarena je koncentracija etanola od 10% m/m, prinos etanola na skrob 0,55 g/g, prinos etanola u odnosu na teorijski 98,08% i volumetrijska produktivnost etanola 2,13 g/lh (Nikolić i sar., 2009a).

U radu Ghorbani i sar. (2011) ćelije *S. cerevisiae* imobilisane u kuglicama Ca-alginata su korišćene za kontinualnu fermentaciju melase šećerne trske, početne koncentracije šećera 50, 100 i 150 g/l i pH vrednosti 4,5 pri brzinama razblaženja 0,064 h⁻¹, 0,096 h⁻¹, 0,144 h⁻¹ i 0,192 h⁻¹. Ostvarena je maksimalna konverzija šećera 96%, koncentracija etanola 19,15 g/l, produktivnost etanola 2,39 g/lh i prinos etanola u odnosu na teorijski 46,23%.

Ćelije kvasca *S. uvarum* imobilisane u kuglicama Ca-alginata se mogu primeniti za alkoholnu fermentaciju sladovine u proizvodnji piva. Alkoholnom fermentacijom sladovine pomoću ovako imobilisanih ćelija kvasca u pneumatskom bioreaktoru sa unutrašnjom cirkulacijom skraćuje se trajanje procesa proizvodnje piva oko deset puta u odnosu na tradicionalan način proizvodnje piva (Nedović, 1999).

Branberg i sar. (2007) su ispitivali kontinualnu fermentaciju lignocelulozih hidrolizata i došli do zaključka da primena imobilisanih ćelija *S. cerevisiae* omogućava kontinualnu fermentaciju pri značajno višim brzinama razblaženja u poređenju sa slobodnim ćelijama kvasca.

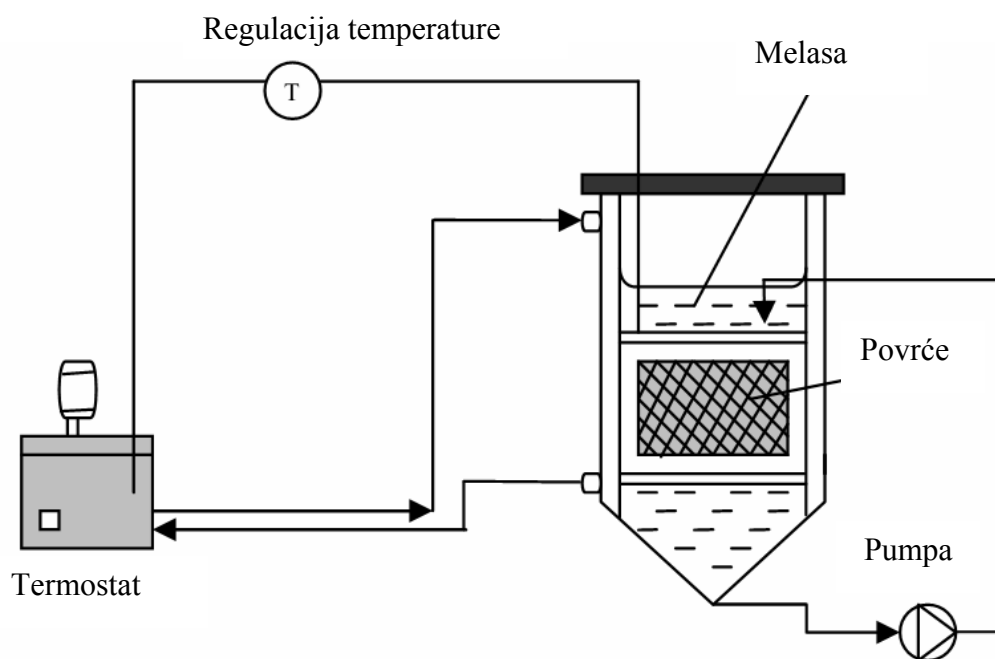
Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se za razliku od ćelija kvasca imobilisanih adsorpcijom na biljnim materijalima, ćelije kvasca imobilisane umrežavanjem u kuglicama Ca-alginata uspešno primenjuju, kako za fermentaciju šećernih sirovina, tako i za fermentaciju hidrolizata skrobnih i lignoceluloznih sirovina.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. Materijal

3.1.1. Podloge za fermentaciju

Za pripremu podloga za fermentaciju su korišćeni melasa i gusti sok iz istog procesa prerade šećerne repe domaćeg proizvođača šećera. Takođe je za pripremu podloga za fermentaciju korišćena melasa preostala nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve. Povrće je pre upotrebe za osmotsku dehidraciju čuvano na temperaturi od oko 4 °C, a zatim temeljno oprano i isečeno u kockice veličine 1x1 cm. Osmotska dehidracija povrća je izvedena recirkulacijom melase do postizanja ravnotežnog sadržaja vlage pri atmosferskom pritisku i temperaturi 45°C, u aparaturi prikazanoj na slici 3.1. Odnos mase uzorka prema melasi je bio 1:4, a imerzija je trajala 5 sati.



Slika 3.1. Šema aparature za osmotsku dehidraciju povrća (Koprivica i sar., 2009).

Podloge za fermentaciju su pripremljene rastvaranjem melase i gustog soka u destilovanoj vodi do početnog sadržaja šećera 100-300 g/l, pH vrednost je podešena na 5,5 dodatkom 10% H₂SO₄, a zatim su podloge sterilisane u autoklavu (121 °C, 30 min).

3.1.2. Proizvodni mikroorganizam

Kao proizvodni mikroorganizam u eksperimentima je primenjen kvasac *S. cerevisiae* i to:

- svež pekarski kvasac domaćeg proizvođača, Srbija,
- čista kultura kvasca *S. cerevisiae* (DTN) iz Zbirke kultura odeljenja mikrobiologije, Tehnološki Fakultet, Univerzitet Novi Sad, Srbija.

Pre svakog eksperimenta, svež pekarski kvasac je suspendovan u fiziološkom rastvoru u cilju formiranja osnovne suspenzije kvasca.

Čista kultura *S. cerevisiae* DTN je čuvana na sterilnom kosom sladnom agaru i održavana presejavanjem, na svež medijum. Kosi sladni agar je bio sledećeg sastava (g/l): glukoza 20, pepton 10, ekstrakt kvasca 5 i agar 20. Vrednost pH medijuma je podešena na 7, dodatkom 5 M rastvora NaOH, a zatim je medijum sterilisan u autoklavu pri temperaturi 120 °C u trajanju od 20 min. Kultura je čuvana u frižideru na 4°C. Pre početka eksperimenta mikroorganizam je pod sterilnim uslovima inokulisan na sveži kosi agar (gore opisanog sastava) u staklenim epruvetama, a zatim inkubiran 24 h na temperaturi od 30°C. Po isteku 24 h mikroorganizam je pod sterilnim uslovima prenet u seriju epruveta sa kosim agarom istog sastava i inkubiran u trajanju od 24 h na 30°C, kako bi se dobile ćelije kvasca u ekspanzionalnoj fazi rasta. Kultura kvasca je sa kosog agara prenet u 100 ml sterilne tečne hranjive podloge (sastava (g/l): glukoza 20, pepton 10, ekstrakt kvasca 10; pH 4,5) u Erlenmeyer sudove od 250 ml. Ćelije su umnožavane u aerobnim uslovima u termostatu na tresilici (GFL, Germany, Type 3015; 120 o/min, prečnik obrtanja 30 mm) u trajanju od 24 h pri 30 °C. Ćelije su odvojene centrifugiranjem (3000 o/min, 10 min), a zatim su resuspendovane u sterilnom fiziološkom rastvoru, pa ponovo centrifugirane. Osnovna suspenzija je dobijena resuspendovanjem kvasca u sterilnom fiziološkom rastvoru.

Odgovarajuća količina osnovne suspenzije kvasca je korišćena direktno kao inokulum za fermentaciju, kao slobodne ćelije kvasca i/ili za imobilizaciju ćelija kvasca na ispitivanim nosačima, odnosno za pripremu odgovarajućeg imobilisanog biokatalizatora kao inokuluma.

3.1.3. Nosači za imobilizaciju proizvodnog mikroorganizma

3.1.3.1. Presovani rezanci šećerne repe (PRŠR), suvi rezanci šećerne repe (SRŠR) i parenhimsko tkivo stabla kukuruza (PTSK)

Kao nosači za imobilizaciju kvasca prirodnom adsorpcijom, korišćeni su rezanci šećerne repe (RŠR) iz fabrike šećera TE-TO Senta, Srbija, u dve komercijalne forme:

- sveži presovani rezanci šećerne repe (PRŠR),
- suvi rezanci šećerne repe (SRŠR).

Takođe su kao nosači za imobilizaciju ćelija kvasca upotrebljene nadzemne internodije stabla kukuruza hibrida NS 444, NS 3014, NS 5043, NS 6010, NS 6030 i NS 7016, seče kukuruzovine 2008. godine, iz monokulture kukuruza sa lokaliteta Rimski Šančevi, Srbija, kao i stabla hibrida kukuruza šećerca Gold Cup sa lokaliteta Budisava, Srbija. Stabla su do upotrebe skladištena na sobnoj temperaturi. U cilju izdvajanja parenhiskog tkiva, spoljni omotač stabla kukuruza kao i nodije su ručno uklonjeni nožem. Parenhimsko tkivo stabla kukuruza (PTSK) je isečeno na režnjeve u obliku diska prečnika 1,5-2 cm i visine 0,5 cm.

Prema potrebi analize nosači su osušeni do konstantne mase i samleveni na laboratorijskom mlinu Miag-Braunschweig, type Doxy 71b/4, snage 0,22kW pri 1375 r/min. Dobijeno je mlivo sa dimenzijama čestica ispod 1000 μm .

3.1.3.1. Ca-alginat

Za pripremu polimera Ca-alginata korišćen je 2% m/v rastvor Na-alginata (Fluka Chemie AG, Švajcarska) i 0,1 M rastvor CaCl_2 (Merck, Germany). Rastvori su sterilisani u autoklavu (5 min, 121°C). U momentu kontakta između Na-alginata i rastvora CaCl_2 dolazi do razmene jona Na^+ i Ca^{2+} i formiranja čvrstog polimera Ca-alginata.

3.2. Metodi rada

3.2.1. Analiza PRŠR, SRŠR i PTSK

3.2.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike

U nosačima je određen sadržaj suve mase, pepela, azota i proteina. Specifična zapremina mliva (g/l) nosača određena je merenjem suve mase mliva koju ima jedinica zapremine mliva u menzuri.

Indeks adsorpcije vode nosača (*WAI*, g/g), kao merilo hidrofилnosti, je određen metodom po Anderson-u i sar. (1969). Ukratko, odabrani nosači su sušeni na 55 °C do konstantne mase i samleveni na laboratorijskom mlinu do postizanja dimenzija čestica oko 50 μm . Uzorak mliva (1,25 g) je postepeno suspendovan u 15 ml destilovane vode u tariranoj kiveti za centrifugu zapremine 50 ml. Usled izrazite hidrofилnosti, količina PTSK upotrebljena za ovu analizu je redukovana na 0,125 g kako bi se prilagodila eksperimentalnim uslovima. Smeša je mešana staklenim štapićem u trajanju od 1 min na sobnoj temperaturi (25 °C) i centrifugisana pri 3000 \times g u trajanju od 10 min. Supernatant je odliven, izmerena je masa preostalog gela, a *WAI* (g/g) je izražen kao masa gela po jedinici mase suvog nosača.

U cilju ispitivanja uticaja autoklaviranja na hidrataciju i sposobnost vezivanja vode navedenih nosača 1 g suve mase mliva nosača je suspendovano u 100 ml destilovane vode i 10% (v/v) rastvora etanola, u Erlenmeyer sudovima zapremine 300 ml. Suspenzije su sterilisane u autoklavu (121°C, 30 min). Neposredno nakon sterilizacije, za razliku od PRŠR i SRŠR, deo PTSK je i dalje plutao na površini tečnosti. U cilju efikasne deaeracije i hidratacije nosača, sudovi su ohlađeni i postavljeni na tresilicu (GFL, Germany, Type

3015, 120 o/min) u termostatu (25°C) u trajanju od 24 h. Eksperimenti su izvedeni u dve probe i po isteku 24 h, analizirane su karakteristike hidratiranih nosača.

Analiza fizičkih karakteristika ovako hidratiranih nosača je obavljena na sledeći način. Nosači su izdvojeni filtracijom i sadržaj vode hidratiranih nosača je određen metodom sušenja na 105 °C do konstantne mase. Stepenn hidratacije nosača (H , g/g) je izračunat kao odnos mase vezane vode po jedinici suve mase nosača. Stepenn upijanja vode (S , g/g) je izračunat kao masa upijene vode (izračunate iz razlike mase hidratiranog nosača i početne mase nosača) po gramu suve mase nosača (Öztop i sar., 2003).

Kako bi se ispitala potencijalna ekstrakcija i rastvaranje komponenti iz nosača nakon postupka hidratacije u dobijenom filtratu (vodenom i alkoholnom ekstraktu) je određen sadržaj šećera, azota, proteina, rastvorljivih soli (TDS, engl. total dissolved solids), a takođe je izmerena pH vrednost, električna provodljivost i otpornost ekstrakata.

3.2.1.2. Imobilizacioni potencijal nosača i parametri imobilizacije kvasca

U cilju ispitivanja i poređenja imobilizacionog potencijala PRŠR, SRŠR i PTSK, kvasac je imobilisan pod istim eksperimentalnim uslovima. Primenjen je modifikovan postupak imobilizacije ćelija opisan od strane Plessas i sar. (2007), ali prilagođen prirodi ispitivanih nosača i eksperimentalnim uslovima. Eksperimenti su izvedeni u dve probe. U Erlenmeyer sudove od 1000 ml preneto je po 5 g suve mase pripremljenih nosača (rezanci šećerne repe u izvornom obliku i PTSK u obliku diska) i 500 ml sintetskog medijuma sastava (g/l): 120 glukoze, 1 (NH₄)₂ SO₄, 1 KH₂PO₄, 5 MgSO₄, 4 ekstrakt kvasca. Sudovi su zatim sterilisani u autoklavu (121 °C, 30 min). U cilju efikasne hidratacije i deaeracije nosača, sudovi su ohlađeni i postavljeni u termostat (30°C) na tresilicu (120 o/min) u trajanju 24 h. Proizvodni mikroorganizam je dodat u Erlenmeyer sudove u količini od 1,5 g suve mase kvasca prenošenjem odgovarajuće količine osnovne suspenzije kvasca. Imobilizacija ćelija je obavljena inkubiranjem u termostatu (30°C), na tresilici (120 o/min) u toku 24 h.

Po završetku imobilizacije su određeni parametri imobilizacije kvasca na PRŠR, SRŠR i PTSK. Stepenn imobilizacije ćelija R_i (g/g) izračunat je kao maseni odnos suve mase imobilisanih ćelija kvasca i suve mase nosača. Stepenn imobilizacije predstavlja zbir stepena adsorpcije i stepena zadržavanja ćelija kapilarnim silama ($R_i = R_a + R_v$). Stepenn adsorpcije ćelija R_a (g/g) je izračunat je kao maseni odnos suve mase adsorbovanih ćelija kvasca na suvoj masi nosača. Stepenn zadržavanja ćelija kapilarnim silama R_v (g/g) predstavlja suhu masu ćelija kvasca koje su vezane kapilarnim silama u nosaču i izračunat je iz razlike stepena imobilizacije i stepena adsorpcije ćelija kvasca. Efikasnost adsorpcije Y_a (%) i efikasnost zadržavanja Y_v (%) predstavljaju udeo suve mase adsorbovanih ćelija i udeo mase ćelija vezanih kapilarnim silama u suvoj masi imobilisanih ćelija kvasca. Koncentracija imobilisanih ćelija X_i (g/l) je izračunata na osnovu odnosa suve mase imobilisanih ćelija kvasca na nosaču i ukupne zapremine medijuma. Efikasnost imobilizacije Y_i (%) predstavlja maseni udeo suve mase imobilisanih ćelija u ukupnoj suvoj masi ćelija kvasca (imobilisanih i slobodnih). Efikasnost imobilizacije je izračunata kao odnos koncentracije imobilisanih ćelija (X_i) i ukupne koncentracije ćelija kvasca (X_t) (zbir imobilisanih i slobodnih ćelija, g/l), pomnožen sa 100 (Santos i sar., 2008).

3.2.1.3. Adsorpcione karakteristike

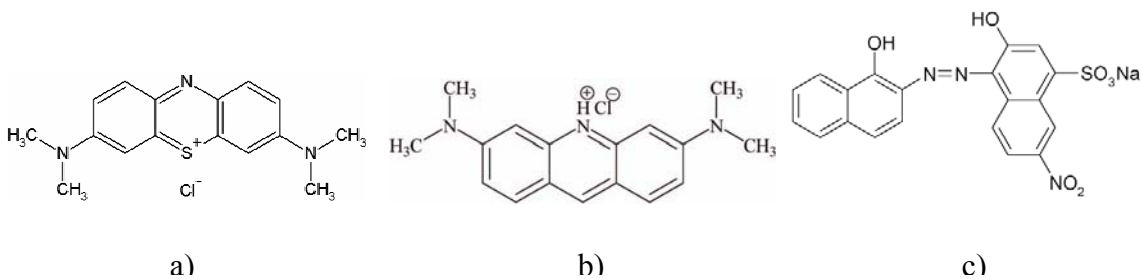
Adsorpcija katjonskih i anjonskih boja na PRŠR, SRŠR i PTSK je izvršena u cilju karakterizacije ispitivanih nosača, tj. sticanja detaljnih saznanja o naelektrisanju površine i adsorpcionim karakteristikama nosača. Ova saznanja predstavljaju osnovni preduslov za dobro razumevanje adsorpcije ćelija kvasca na odgovarajuće aktivne centre. Takođe, ispitan je uticaj koncentracije boje i pH vrednosti rastvora na proces adsorpcije boja i naelektrisanje površine nosača.

Adsorbenti

PRŠR, SRŠR i PTSK (hibrida Gold Cup u obliku cilinara) su intenzivno oprani i tri puta kuvani (10 min) u destilovanoj vodi, u cilju hidratacije materijala, uklanjanja ekstrahovanih komponenti, mehaničkih nečistoća i prašine. Nosači su zatim izdvojeni iz vode filtracijom i sušeni u sušnici pri 60 °C do konstantne mase. Osušeni materijal je samleven na gore navedenom laboratorijskom mlinu do dobijanja mliva sa dimenzijama čestica ispod 1000 µm. Mlivo je čuvano u zatvorenim staklenim sudovima do primene u adsorpcionim eksperimentima.

Adsorbati

Katjonske boje Metilensko plavo (MP) i Akridin oranž (AO), kao i anjonska boja Eriohrom crno T (ECT), su upotrebljene kao adsorbati za pripremu model-rastvora. U radu su upotrebljene boje p.a. čistoće: Metilensko plavo (3,7-bis(Dimethylamino)-phenazathionium chloride tetramethylthionine chloride; $M=373,9$ g/mol, $\lambda_{\max}=668$ nm) i akridin oranž (acridine orange zinkchlorid double salt, $C_{17}H_{20}ClN_3 \cdot ZnCl_2$; $M= 319,86$ g/mol, $\lambda_{\max}: 490$ nm) proizvođača Merck, Germany, kao i Eriohrom crno T (Sodium 4-[1-hydroxynaphthalen-2-yl-hydrazinylidene]-7-nitro-3-oxo-Y-naphthalene-1-sulfonate; $M=461,38$ g/mol, $\lambda_{\max}=526$ nm) proizvođača Centrohém, Srbija. Strukturna formula primenjenih boja je predstavljena na slici 3.2. Rastvori boja (20, 30, 40 i 50 mg/l) su pripremljeni rastvaranjem gore navedenih jedinjenja u destilovanoj vodi bez dodatnih tretmana. Primenjene su relativno niske inicijalne koncentracije boja kako bi se obezbedilo potpuno rastvaranje i disocijacija boja. Vrednost pH rastvora (2, 4, 5, 6 i 8) je podešena pomoću 0,1 M NaOH i 0,1 M HCl primenom pH metra.



Slika 3.2. Strukturna formula adsorbata: a) Metilensko plavo, b) Akridin oranž, c) Eriohrom crno T.

Adsorpcioni eksperimenti

Diskontinualni adsorpcioni eksperimenti su izvođeni dodatakom odgovarajuće doze adsorbenta, u više staklenih Erlenmeyer sudova zapremine 300 ml koji su sadržali po 200 ml rastvora boje različite početne koncentracije (20, 30, 40 i 50 mg/l) i pH vrednosti (2, 4, 5, 6 i 8). Sudovi su postavljeni na tresilicu u termostatu, pri brzini obrtaja od 120 o/min na temperaturi 25 °C. Adsorpcija je praćena 240 minuta, što je dovoljno da se postigne ravnoteža. Uzorci (10 ml) su uzimani u odgovarajućim vremenskim intervalima. U slučaju primene PRŠR i SRŠR kao adsorbenta uzorci su centrifugirani pri 3000 o/min, kako bi se odvojila čvrsta od tečne faze. U slučaju primene PTSK, centrifugiranjem se nije postiglo zadovoljavajuće razdvajanje, pa su uzorci su filtrirani na staklenim guć filtrima (B4). Koncentracija boja u tečnoj fazi (supernatantima, odnosno filtratima) je određena spektrofotometrijski, merenjem optičke gustine na odgovarajućim talasnim dužinama λ_{\max} (668 nm, 490 nm i 526 nm za MP, AO i ECT) pomoću spektrofotometra, a na osnovu prethodno konstruisane kalibracione krive.

Adsorpcione izoterme

Adsorpcione izoterme su poslužile za opisivanje interakcija između adsorbata i adsorbenta i upoređivanja maksimalnog adsorpcionog kapaciteta PRŠR, SRŠR i PTSK da vezuju katjonske i anjonske komponente. Eksperimentalni rezultati (stanje ravnoteže) su analizirani primenom dobro poznatih adsorpcionih modela: Freundlich (Freundlich, 1906), Langmuir (Langmuir, 1916) i Temkin (Temkin i Pizhev, 1940). Primenjivost odnosno adekvatnost modela je procenjena linearnom regresionom analizom na osnovu koeficijenta determinacije (R^2).

Količina adsorbovane boje u vremenu t , q_t (mg/g) kao i u nakon postizanja ravnoteže, q_e (mg/g) je izračunata na sledeći način:

$$q_t = \frac{(C_o - C_t)V}{W} \quad (1)$$

$$q_e = \frac{(C_o - C_e)V}{W} \quad (2)$$

gde su C_o , C_t i C_e koncentracije adsorbata u tečnoj fazi pre početka adsorpcije, u momentu t i u momentu postizanja ravnoteže. V (l) je zapremina rastvora, a W (g) je masa dodatog suvog adsorbenta.

Freundlich-ova adsorpciona izoterma predstavlja najstariju poznatu empirijsku jednačinu koja je u skladu sa eksponencijalnom raspodelom aktivnih centara, koja je karakteristična za heterogene površine adsorbenta. Linearizovani oblik Freundlich-ove izoterme izražen je na sledeći način:

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad (3)$$

gde je C_e (mg/l) ravnotežna koncentracije boje u tečnoj fazi, q_e (mg/g) – količina boje adsorbovana u ravnoteži, K_f i n – Freundlich-ove konstante - indikatori adsorpcionog kapaciteta i adsorpcionog intenziteta.

Langmuir-ova adsorpciona izoterma pretpostavlja uniformu adsorpciju na površinu adsorbensa i zasniva se na pretpostavci o postojanju monoslojne adsorpcije na potpuno homogenoj površini, konačnom broju aktivnih centara i na zanemarljivoj interakciji između adsorbovanih molekula. Langmuir-ov model izoterme u linearizovanoj formi se izražava na sledeći način:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{K_a q_m C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (4)$$

q_m (mg/g) i K_a (l/mg) – Langmuir-ove konstante povezane sa kapacitetom adsorpcije i energijom adsorpcije. Konstanta q_m predstavlja maksimalni kapacitet adsorbenta, kada je površina adsorbenta u potpunosti pokrivena bojom, i naročito je značajana u eksperimentima u kojima nije postignuto potpuno zasićenje.

Temkin-ova adsorpciona izoterma se koristi kako bi se ispitala razmena energije, uzimajući u obzir interakcije između adsorbata i adsorbenta. Linearni oblik ove izoterme se može izraziti na sledeći način:

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad (5)$$

$B=RT/b$ (J/mol) – Temkin-ova konstanta (u vezi je sa energijom sorpcije), R – univerzalna gasna konstanta (8,314 J/mol K), T (K) – apsolutna temperatura, b i A (l/g) - Temkin-ove konstante.

3.2.2. Priprema imobilisanog biokatalizatora za fermentaciju

3.2.2.1. Imobilizacija kvasca na SRŠR i PTSK

Imobilizacija kvasca na PTSK (u obliku diska) je obavljena prema gore (3.2.1.2.) opisanoj proceduri. Međutim, ispitivani hidratizirani nosači imaju različite fizičke karakteristike. Kako bi se obezbedili slični uslovi imobilizacije odnosno dodala masa nosača koja zauzima jednaku zapreminu u sudu i pri tome zadržao odgovarajući odnos mase nosača za imobilizaciju i suve mase kvasca u postupku imobilizacije kvasca na SRŠR dodato je 15 g nosača i 4,5 g suve mase kvasca.

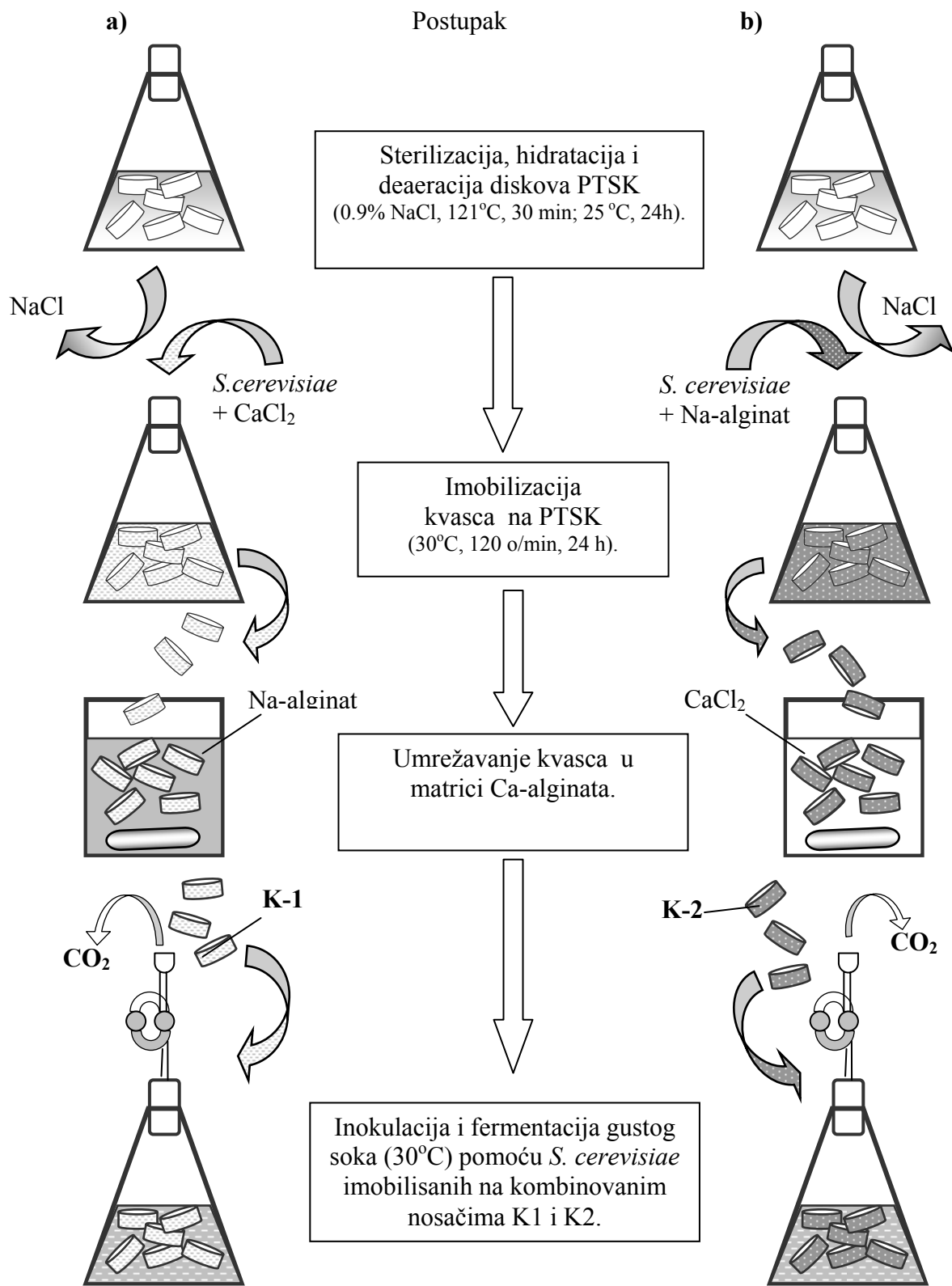
Nakon imobilizacije, tečni medijum iz suda je odličen, biokatalizator je ispran sa 500 ml sterilne podloge za fermentaciju (melase i gustog soka) kako bi se uklonile neadsorbovane ćelije kvasca i preostale komponente sintetskog medijuma, a zatim je u sud dodato novih 500 ml podloge i započeta je fermentacija.

3.2.2.2. Imobilizacija kvasca kombinovanjem adsorpcije na diskovima PTSK i umrežavanja u Ca-alginatu

Kako bi se postigao visok stepen imobilizacije kvasca i sprečilo ispiranje imobilisanih ćelija sa PTSK tokom fermentacije, primenjena su dva različita postupka imobilizacije kvasca kombinovanjem prirodne imobilizacije kvasca (adsorpcije i vezivanja ćelija kapilarnim silama) na diskovima PTSK i umrežavanja u matrici Ca-alginata (Slika 3.3.).

Diskovi PTSK su dodati u fiziološki rastvor (0,9% NaCl) u količini od 5 g suve mase diskova PTSK na 500 ml fiziološkog rastvora u Erlenmeyer sudu od 1000 ml, a zatim sterilisani u autoklavu (121 °C, 30 min) i hidratizirani u termostatu (30°C) na tresilici (120 o/min) u trajanju od 24h. Na hidratiziranim diskovima PTSK je proizvodni mikroorganizam imobilisan kombinovanom metodom imobilizacije primenom dva različita postupka (Slika 3.3).

Imobilizacija kvasca na disku PTSK koji je obložen slojem Ca-alginata (K1) prikazana je na slici 3.3.a). Nakon hidratacije u fiziološkom rastvoru tečna faza je odličena pod aseptičnim uslovima, a zatim je u sud sa nosačem dodato 500 ml suspenzije kvasca koja sadrži 6 g suve materije kvasca u 0,1 M rastvoru CaCl₂. Imobilizacija je obavljena u termostatu pri 30°C, na tresilici pri 120 o/min u trajanju od 24 h, kako bi se omogućila difuzija i adsorpcija kvasca na PTSK. Po isteku 24 h suspenzija kvasca je odličena, a diskovi nosača su pojedinačno preneti u pripremljeni sterilan rastvor Na-alginata (2% m/v), uz intenzivno mešanje (300 o/min) u trajanju od 15 minuta, u cilju očvršćavanja polimera i postizanja stabilnosti gela. Na ovaj način kvasac je imobilisan na disku PTSK koji je obložen Ca-alginatom (K1).



Slika 3.3. Kombinovana imobilizacija kvasca na diskovima PTSK: a) obloženim Ca-alginatom (K1) i b) ispunjenm Ca-alginatom (K2).

Imobilizacija kvasca na disku PTSK koji je ispunjen Ca-alginatom (K2) prikazan je na slici 3.3.b. Nakon hidratacije nosača u fiziološkom rastvoru, pod aseptičnim uslovima odlivena je tečna faza, a zatim je u sud sa nosačem dodato 500 ml suspenzije kvasca u rastvoru Na-alginata (2% m/v). Zatim je imobilizacija obavljena u termostatu (30°C), na tresilici pri 120 o/min u trajanju od 24 h. Po isteku 24 h odlivena je suspenzija kvasca, a diskovi nosača su pojedinačno preneti u pripremljeni sterilni 0,1 M rastvor CaCl₂ uz intenzivno mešanje (300 o/min) u trajanju od 15 minuta, u cilju očvršćavanja polimera i postizanja stabilnosti gela. Na ovaj način kvasac je imobilisan na disku PTSK ispunjenim Ca-alginatom (K2).

Novi mobilisani biokatalizator K1 i K2 je prenet u Erlenmeyer sud od 1000 ml, koji sadrži 500 ml odgovarajuće sterilisane podloge za fermentaciju.

3.2.2.3. Imobilizacija kvasca u kuglicama Ca-alginata i u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK

Umrežavanje kvasca u Ca-alginatu izvedeno je metodom ukapavanja. Pripremljena je smeša osnovne suspenzije kvasca (0,6 g sm/10 ml) i rastvora Na-alginata u zapreminskom odnosu 1:1. Ovako pripremljena smeša (20 ml) je ukapavana u 0,1 M rastvor CaCl₂ pomoću pipete prečnika otvora 3 mm sa visine 10 mm, uz stalno mešanje rastvora pri brzini magnetne mešalice 300 o/min. U momentu kontakta između kapi suspenzije i rastvora CaCl₂ dolazi do razmene jona Na⁺ i Ca²⁺ i očvršćavanja kapi u vidu kuglica prečnika 3-4 mm. Formirane kuglice Ca-alginata sa imobilisanim kvascem (AB) su mešane u rastvoru CaCl₂ u trajanju od 10 minuta, u cilju očvršćavanja i postizanja stabilnosti gela.

U cilju formiranja kuglica novog kombinovanog nosača od Ca-alginata i PTSK (ABC) mlivo PTSK hibrida Gold Cup je suspendovano u fiziološkom rastvoru u količini od 0,3 g/10 ml pre sterilizacije i pripreme osnovne suspenzije. Dalja procedura za pripremu ABC kuglica je identična kao ona opisana za AB kuglice. Prečnik formiranih ABC kuglica je bio 5 mm.

Ovako formirane kuglice su upotrebljene za inokulaciju 200 ml sterilisane podloge u Erlenmeyer sudu od 500 ml, u cilju izvođenja diskontinualne fermentacije.

Za kontinualnu fermentaciju je bila potrebna značajno veća količina imobilisanog biokatalizatora pa je imobilizacija kvasca u kombinovanim kuglicama (ABC) obavljena na gore opisan način ukapavanjem 300 ml smeše (suspenzija kvasca-mlivo PTSK-Na-alginat) u 0,1 M rastvor CaCl₂.

3.2.3. Fermentacija

3.2.3.1. Diskontinualna fermentacija

Diskontinualna fermentacija melase i gustog soka je izvedena u tri probe u anaerobnim uslovima u termostatu pri temperaturi od 30°C. Dinamika fermentacije je praćena merenjem mase izdvojenog CO₂ i/ili merenjem sadržaja šećera i etanola u fermentisanoj podlozi u određenim vremenskim intervalima. Uzorci fermentisane podloge su centrifugisani pri 3000 o/min, a zatim je u supernatantu određena koncentracija šećera, provodljivost, otpornost, ukupan sadržaj rastvorljivih soli (TDS) i pH vrednost. U cilju određivanja sadržaja šećera uzorci supernatanta su prvobitno hidrolizovani dodatkom 33% HCl pri 100 °C u trajanju od 10 minuta i neutralisani dodatkom 5M KOH.

Kako bi se ispitala mogućnost višestruke upotrebe imobilisanog biokatalizatora u ponovljenim diskontinualnim fermentacijama, po završetku svake fermentacije, podloge su odlivene, a zatim analizirane i destilisane. Pod aseptičnim uslovima u sud sa nosačem je dodato novih 500 ml sterilne podloge istog početnog sadržaja šećera, a zatim je postavljena sledeća fermentacija.

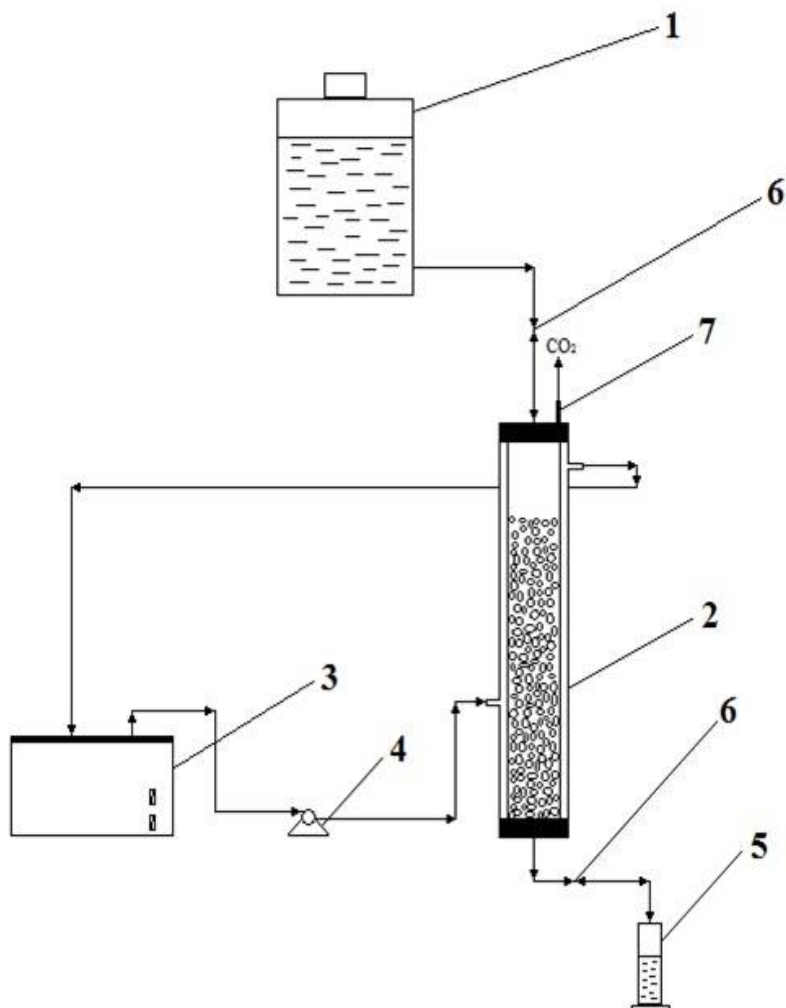
3.2.3.2. Kontinualna fermentacija

Kontinualna fermentacija gustog soka početne koncentracije šećera 300 g/l (VHG uslovi) izvođena je u anaerobnim uslovima pomoću kvasca imobilisanog u ABC kuglicama u aparaturi prikazanoj na slici 3.4. Kao bioreaktor upotrebljena je staklena kolona za fermentaciju unutrašnjeg prečnika 5,5 cm, visine 24 cm, ukupne zapremine 570 cm³. Održavanje radne temperature ostvareno je cirkulacijom destilovane vode temperature 30 °C iz vodenog termostata kroz duple zidove kolone, pomoću peristaltičke pumpe (CH-8152, Model MSC-WM5, Glattbrugg-Zürich, Germany).

Formirane ABC kuglice prečnika oko 5 mm su prvobitno isprane sa 500 ml fermentacione podloge, a zatim prenete u kolonu za fermentaciju koja je sa priključnim elementima i nastavkom za izdvajanje CO₂ (vranjem) prethodno sterilisana u autoklavu (121°C, 30 min).

Sterilna podloga za fermentaciju na bazi gustog soka je dozirana slobodnim padom u kolonu iz cilindričnog staklenog suda zapremine 10 l. Podloga je dozirana u kolonu do ukupne radne zapremine 540 cm³ (približno 95% od ukupne zapremine kolone). Fermentisana podloga je prihvatana u zatvorenoj sterilnoj menzuri zapremine 1l koja je služila kao prihvatni sud.

Brzina razblaženja D (h⁻¹) u kontinualnim fermentacionim sistemima predstavlja količnik protoka podloge (u ml/h) i ukupne radne zapremine reaktora (u ml) odnosno (Ghorbani i sar., 2011). Kontinualna fermentacija je prvih pet dana izvođena pri protoku podloge 15 ml/h, zatim pet dana pri protoku 12,5 ml/h i još pet dana pri protoku 10 ml/h što odgovara brzini razblaženja od 0,028 h⁻¹, 0,023 h⁻¹ i 0,019 h⁻¹. Odgovarajući parametri fermentacije su izračunati na osnovu dnevnih analiza uzoraka fermentisane podloge.



Slika 3.4. Sistem za kontinualnu fermentaciju gustog soka pomoću ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na kombinovanim kuglicama (ABC) od Ca-alginata i mliva PTSK: 1-boca sa sterilnom hranljivom podlogom, 2-kolona za kontinualnu fermentaciju sa imobilisanim ćelijama *S. cerevisiae*, 3-termostat, 4-peristaltička pumpa za cirkulaciju vode iz termostata, 5-prihvatni sud, 6-ventil, 7-vranj.

3.2.4. Analitičke metode

Sadržaj suve mase i pepela u nosačima je određen gravimetrijski sušenjem do konstantne mase na 105 °C, odnosno žarenjem na 570 °C. Sadržaj proteina u nosačima je određen Kjeldahl-metodom (AOAC method 920.53, 2000).

Sadržaj suve mase i gustina melase i gustog soka određena je areometrom po Balingu pri 17,5 °C. Sadržaj suve mase, ukupnog šećera, saharoze, ukupnog azota, amino azota i pepela u melasi i gustom soku određen je standardnim AOAC metodama (AOAC metode:

966.20, 968.28, 970.57, 969.37, 977.08, 969.36; 2000). Boja rastvora melase i gustog soka koncentracije 1 g/l je izmerena Hellige komparatorom prema metodi European Brewery Convention Analysis Committee (EBC, 1998).

Provodljivost, otpornost, ukupan sadržaj rastvorljivih soli (TDS) i pH vrednost podloga i ekstraktata PRŠR, SRŠR i PTSK su mereni laboratorijskim multiparametarskim analizatorom Consort C863 (Consort, Belgija). Sadržaj šećera u fermentisanim podlogama i ekstraktima PRŠR, SRŠR i PTSK je određen DNS metodom (Miller, 1959). Fermentisane podloge su destilisane, a zatim je sadržaj etanola u dobijenom destilatu određen piknometrijski (AOAC metoda 942.06, 2000) ili spektrofotometrijskom dihromatskom metodom merenjem optičke gustine pri 660 nm (Caputi i sar., 1968). Sadržaj acetaldehida, etilacetata, sirćetne kiseline, metanola i furfurala u odabranim destilatima je određen standardnim AOAC metodama 972.08, 950.05, 962.12, 958.04, 960.16, a izražen je u mg po litri apsolutnog alkohola (mg/l a.a.) (AOAC, 2000). Sadržaj viših alkohola kao smeša izoamil alkohola i izobutil alkohola (3:1) je određen spektrofotometrijski primenom 4-dimetil-aminobenzaldehida kao bojenog reagensa prema AOAC metodi 9.082 (1984).

Količina imobilisanih ćelija kvasca (adsorbovanih i vezanih kapilarnim silama) na nosačima određena je gravimetrijski (Santos i sar., 2008). Sadržaj suve mase imobilisanih ćelija kvasca na nosaču određen je gravimetrijski sušenjem izdvojenog nosača sa imobilisanim ćelijama pri 105°C. Pored toga, kako bi se odredila tačna količina adsorbovanih ćelija na nosaču u paralelnoj probi nakon imobilizacije nosač je prvo ispran sa novih 500 ml vode, kako bi se uklonile neadsorbovane ćelije (zadržane u nosaču kapilarnim silama), a zatim je sušenjem nosača određena masa adsorbovanih ćelija. Sadržaj suve mase slobodnih ćelija je određen merenjem absorbance pri 660 nm na spektrofotometru (Carl Zeiss Jena, Germany), i izračunat na osnovu prethodno konstruisane kalibracione krive. Kako bi se izbegla greška u optičkim i gravimetrijskim merenjima kao kontrola je izvedena identična procedura za nosač izdvojen iz medijuma bez dodatka ćelija kvasca. Broj slobodnih ćelija po jedinici zapremine fermentisane podloge kao i udeo živih ćelija procenjen je mikroskopski u preparatima obojenim metilensko plavim, brojanjem ćelija na Neubauer-ovoj komori pri uvećanju od 400 x (Vrbaški i Markov, 1992). Za određivanje količine proizvodnog mikroorganizma imobilisanog u Calginatu, polimer je prvo rastvoren u 2% rastvoru Na-citrata, a zatim je mikroskopski određen broj ćelija.

3.2.5. Parametri fermentacije

Količina usvojenog šećera (S_u , g/l) tokom fermentacije je izračunata iz razlike početne koncentracije šećera u podlozi (S_o , g/l) i koncentracije preostalog šećera u podlozi (S_r). Step konverzije šećera (Y_s , %) je izračunat kao procentualni udeo mase usvojenog šećera u početnoj masi šećera u podlozi za fermentaciju. Prinos etanola ($Y_{p/s}$, g/g) je izračunat kao odnos mase proizvedenog etanola po jedinici mase usvojenog šećera. Takođe je izračunata i efikasnost fermentacije ($E_{p/s}$, %), koja predstavlja procentualni udeo ostvarenog prinosa etanola na usvojeni šećer u odnosu na teorijski prinos etanola na usvojeni šećer (0,511 g/g). Volumetrijska produktivnost etanola (Q_p , g/lh) je izračunata kao masa etanola po litri

fermentisane podloge proizvedena tokom jednog sata fermentacije. Specifična ćelijska produktivnost etanola (q_p , g/gh) predstavlja masu etanola proizvedenu po jedinici suve mase inokuluma kvasca u jedinici vremena.

3.2.6. Optička i elektronska mikroskopija

Struktura nosača i imobilizacija ćelija na površini nosača ispitana je optičkom mikroskopskom analizom, fotografisanjem nativnih preparata nosača i ćelija kvasca imobilisanih na nosaču pomoću Carl Zeiss optičkog mikroskopa, povezanim sa digitalnom kamerom Cannon S50, pri odgovarajućem uvećanju (x 100 ili x 400).

Za elektronsku mikroskopiju (SEM, engl. scanning electron microscopy) uzorci nosača pre i nakon fermentacije su pripremljeni potapanjem u 3,5% rastvor glutaraldehida u trajanju 1 h, a zatim dehidrirani u 50, 70, 90, 95 i 100% rastvoru etanola, nakon čega su preko noći ostavljeni u eksikatoru radi uklanjanja preostale vlage. Na osušeni uzorak je nanet sloj zlata u trajanju od 15 minuta. Ovako pripremljeni uzorci snimljeni su na elektronskom mikroskopu JCM-6460, pri 25 kV, pri odgovarajućem uvećanju

3.2.7. Statistička obrada rezultata

Rezultati eksperimenata, obavljenih pod istim uslovima, su statistički obrađeni analizom varijanse (ANOVA) i aritmetičke sredine su upoređene Sheffe-ovim testom pri stepenu značajnosti $p=0,05$. Rezultati su prikazani u vidu intervalne procene u sledećem obliku:

$$x = \bar{x} \pm \frac{n \cdot \sigma}{\sqrt{n}}$$

gde je \bar{x} aritmetička sredina, σ standardna devijacija, a n broj ponovljenih merenja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Analiza PRŠR, SRŠR i PTSK kao nosača za imobilizaciju kvasca

4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK

Efikasnost adsorpcije ćelija kvasca na nosač kao i fermentaciona sposobnost prirodno imobilisanih ćelija kvasca u velikoj meri zavise od fizičko-hemijskih karakteristika nosača (Fujii i sar. 1999). U skladu sa tim u radu su ispitane i upoređene fizičko-hemijske karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK kao nosača za imobilizaciju. Fizičke karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK (hibrida: NS 444, NS 3014, NS 5043, NS 6010, NS 6030, NS 7016 i Gold Cup) su prikazane u tabeli 4.1., a hemijske karakteristike u tabeli 4.2.

Tabela 4.1. Fizičke karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK.

Nosač	Specifična masa mliva (g/l)	Indeks adsorpcije vode <i>WAI</i> (g/g)
RŠR	70,63 ± 0,50	6,59 ± 0,03
SRŠR	70,74 ± 0,54	6,60 ± 0,02
PTSK		
NS 444	45,20 ± 2,76	22,33 ± 0,01
NS 3014	44,50 ± 3,63	20,62 ± 0,28
NS 5043	44,75 ± 2,11	21,98 ± 0,10
NS 6010	45,88 ± 1,03	22,29 ± 0,15
NS 6030	45,61 ± 0,15	21,20 ± 0,07
NS 7016	45,87 ± 0,20	22,30 ± 0,03
Gold Cup	46,01 ± 2,15	22,41 ± 0,01

Iz tabele 4.1. se može uočiti da je specifična masa mliva PRŠR i SRŠR (70,63 g/dm³, odnosno 70,74 g/dm³) izrazito viša ($p < 0,05$) u poređenju sa PTSK (od 44,50 do 46,01 g/dm³). Veoma niske vrednosti specifične mase mliva PTSK ukazuju na činjenicu da je ovaj materijal veoma lak i rastresit sa izuzetno velikom specifičnom površinom, te da potencijalna primena ovog materijala u sudovima i uređajima za fermentaciju ne izaziva značajno opterećenje istih sopstvenom masom. Usled rastresitosti manipulacija mlivom PTSK je relativno otežana u poređenju sa mlivom PRŠR i SRŠR, jer ovaj materijal pluta na površini tečnosti i neophodno je intenzivno mešanje kako bi se ostvarila deaeracija ovog

materijala. Manipulacija nosačem za imobilizaciju kvasca treba da bude laka i jednostavna (Verbelen i sar., 2006). Na osnovu specifične mase mliva se može zaključiti da je manipulacija i hidratacija PRŠR i SRŠR jednostavnija u poređenju sa PTSK.

Karakteristike površine nosača kao što su veličina pora, sadržaj vode, hidrofilitnost i magnetizam su osnovni faktori koji utiču na aktivnost i fermentativne karakteristike ćelija kvasca imobilisanih prirodnom adsorpcijom (Fujii i sar., 1999). Rast mikroorganizama na površini nosača u velikoj meri zavisi od količine raspoložive vode (Orzua i sar., 2009). Indeks adsorpcije vode (*WAI*) je mera hidrofilitnosti nosača i predstavlja količinu vode adsorbovanu od strane nosača. Ostvarene vrednosti *WAI* za PRŠR ($6,59 \pm 0,03$ g/g) i SRŠR ($6,6 \pm 0,02$ g/g) su više ($p < 0,05$) u poređenju sa *WAI* sledećih agroindustrijskih ostataka: lišće žbunastog Kreozot-a, karibska agava, ljuska jabuke, ljuska pistača, pšenična plevica, ljuska oraha, ostaci prerade pasulja, dok su niže u poređenju sa ljuskom kokosa, ljuskom pomorandže, ljuskom limuna (Orzua i sar., 2009). Posmatrajući rezultate *WAI* za PTSK može se zaključiti da je najniža vrednost ostvarena za hibrid NS 444 ($22,41 \pm 0,01$ g/g), dok je najviša vrednost ostvarena za hibrid Gold Cup ($20,62 \pm 0,28$ g/g), te se PTSK ovog hibrida može smatrati najhidrofilnijim. Vrednosti *WAI* za PTSK svih ispitivanih hibrida su višestruko više u poređenju sa PRŠR, SRŠR i ostalim gore navedenim materijalima ispitanim u literaturi, te se može zaključiti da je ovaj materijal veoma hidrofilan.

Tabela 4.2. Hemijske karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK.

Nosač	Suva masa (% m/m)	Pepeo (% s.m.)	Proteini po Kjeldah-u N x 6,25 (% s.m.)
PRŠR	25,38 ± 0,04	7,83 ± 0,20	8,66 ± 0,35
SRŠR	89,05 ± 0,11	8,25 ± 0,30	8,93 ± 0,21
PTSK			
NS 444	92,52 ± 0,10	3,15 ± 0,23	3,45 ± 0,38
NS 3014	92,39 ± 0,06	4,28 ± 0,44	4,23 ± 0,15
NS 5043	92,35 ± 0,06	2,96 ± 0,38	4,88 ± 0,66
NS 6010	92,60 ± 0,07	3,63 ± 0,62	3,56 ± 0,47
NS 6030	92,96 ± 0,03	4,56 ± 0,25	4,02 ± 0,23
NS 7016	92,96 ± 0,07	3,78 ± 0,92	3,15 ± 0,09
Gold Cup	91,97 ± 0,13	4,11 ± 0,31	3,75 ± 0,34

Na osnovu hemijskih osobina nosača (Tabela 4.2.) se može zaključiti da SRŠR i PTSK imaju visok sadržaj suve mase od oko 89% odnosno oko 92%, te se mogu dugotrajno i bezbedno čuvati. PRŠR imaju sadržaj suve mase oko 25%, te su stoga nestabilan materijal tokom skladištenja. Usled prisustva monosaharida i visokog sadržaja vode PRŠR su pogodni za razvoj spontane mikroflore i predstavljaju pogodan supstrat za razvoj štetnih mikroorganizama usled čega su vrlo kvarljivi (Zheng i sar., 2011). Sadržaj pepela u

nosačima, ukazuje na prisustvo mineralnih materija neophodnih kvascu tokom procesa fermentacije. Sadržaj proteina u PRŠR i SRŠR (8,66% i 8,63%) je gotovo dvostruko viši nego u parenhimskom tkivu stabla kukruza (od 3,15% do 4,88%). Proteini iz ovih nosača mogu potencijalno predstavljati dodatni izvor azota za ćelije kvasca tokom fermentacije.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su PRŠR, SRŠR i PTSK hidrofilni, visokoporozni biomaterijali, male specifične, te da ispunjavaju osnovne fizičko-hemijske kriterijume kao nosači za imobilizaciju ćelija kvasca. Takođe, ovi nosači sadrže hranljive materije koje su neophodne kvascu tokom fermentacije.

Prema navodima Guillon i sar. (1992), postupkom sterilizacije u autoklavu se postiže povećanje moći upijanja vode vlakana šećerne repe. Sterilizacija nosača za imobilizaciju u autoklavu neophodna faza pripreme, stoga je veoma važno ispitati fizičke karakteristike sterilisanih i hidratiranih nosača da bi se utvrdio uticaj procesa sterilizacije i hidratacije na sposobnost vezivanja vode i postojanost, odnosno mehaničku otpornost i strukturu vlakana nosača. Fizičke karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK nakon sterilizacije u autoklavu i hidratacije su prikazane u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Fizičke karakteristike hidratiranih PRŠR, SRŠR i PTSK.

Nosač	Sadržaj vode <i>W</i> (%)	Stepen hidratacije <i>H</i> (g/g)	Stepen upijanja vode <i>S</i> (g/g)
PRŠR	93,13 ± 0,04	13,62 ± 0,16	10,68 ± 0,16
SRŠR	93,09 ± 0,06	13,55 ± 0,21	13,43 ± 0,21
PTSK			
NS 444	96,13 ± 0,01	24,93 ± 0,17	24,85 ± 0,17
NS 3014	95,69 ± 0,05	22,39 ± 0,51	22,31 ± 0,51
NS 5043	96,07 ± 0,01	24,41 ± 0,07	24,32 ± 0,07
NS 6010	96,31 ± 0,06	26,44 ± 0,90	26,37 ± 0,90
NS 6030	96,16 ± 0,01	25,01 ± 0,07	24,94 ± 0,07
NS 7016	96,24 ± 0,01	25,68 ± 0,19	25,61 ± 0,19
Gold Cup	96,53 ± 0,02	28,04 ± 0,08	27,80 ± 0,28

Sadržaj vode (*W*) u hidratiranim PRŠR (93,13%), SRŠR (93,09%) je veoma visok i približno jednak ($p > 0,05$) za ova dva materijala, što znači da je proces hidratacije tokom sterilizacije bio podjednako efikasan za oba materijala. Stepenn hidratacije (*H*) za PRŠR i SRŠR je iznosio 13,62 g/g odnosno 13,55 g/g i statistički se ne razikuje ($p > 0,05$), što pokazuje da oba materijala imaju slične hidrofilne karakteristike. Stepenn upijanja vode (*S*) za PRŠR (10,68 g/g) je viši ($p > 0,05$) nego za SRŠR (13,43 g/g), te se može zaključiti da je tokom procesa hidratacije manje vode upijeno od strane PRŠR nego od strane SRŠR. Na osnovu navedenih rezultata se može zaključiti da proces sušenja presovanih PRŠR u fabrici šećera ne narušava fizičku strukturu i sposobnost hidratacije vlakana ovog materijala.

Sadržaj vode (W) u hidratisanom PTSK je veoma visok i blago osciluje u opsegu od 95,69% za hibrid NS 3014 do 96,53% za hibrid Gold Cup. Ostvarene srednje vrednosti stepena hidratacije (H) za PTSK su bile u opsegu od 22,39 g/g za hibrid NS 3014 do 28,04 g/g za hibrid Gold Cup. Srednje vrednosti stepena upijanja vode (S) za PTSK su bile u opsegu od 22,31 g/g za hibrid NS 3014 do 27,8 g/g za hibrid Gold Cup. Poređenjem karakteristika hidratisanih nosača može se zaključiti da se sterilizacijom u autoklavu postiže veoma efikasna hidratacija za svih ispitivanih materijala, ali PTSK ima viši ($p > 0,05$) stepen upijanja vode i u odnosu na PRŠR i SRŠR.

Mehanička otpornost i čvrstina nosača za imobilizaciju u velikoj meri zavise od zapremine bioreaktora i predstavljaju veoma važan kriterijum pri izboru istog za fermentaciju, naročito ako se radi o ponovljenoj diskontinualnoj ili kontinualnoj fermentaciji (Chandel i sar., 2009). Diskovi PTSK su zadržali početni oblik nakon sterilizacije i hidratacije. Ako se izuzme odvajanje malog broja sprovodnih vlakana sa površine PTSK, do čega je došlo usled intenzivnog međusobnog trenja tokom tretmana na tresilici, može se smatrati da nije došlo do narušavanja fizičke strukture svih ispitivanih nosača, te da su isti pokazali zadovoljavajuću mehaničku čvrstinu. Interesantno je napomenuti da je tokom sterilizacije u autoklavu došlo do izrazitog povećanja mehaničke čvrstine PTSK. Tokom sterilizacije PRŠR i SRŠR je došlo do bubrenja materijala, ali ne i do degradacije. Kako je zapremina hidratisanih PRŠR i SRŠR u sudu bila približno jednaka, može se zaključiti da su suvi rezanci nakon hidratacije povratili svoju početnu zapreminu.

4.1.2. Vodeni i alkoholni ekstrakti PRŠR, SRŠR i PTSK

Ekstrakcija 1,0 g suve mase PRŠR, SRŠR i PTSK u 100 ml destilovane vode ili 10% rastvoru etanola je izvršena kako bi se ispitalo da li tokom sterilizacije u autoklavu ili tokom fermentacije dolazi do eventualne ekstrakcije nekih rastvorljivih komponenti nosača u vodi i nastalom etanolu koje bi mogle uticati na metabolizam i aktivnost kvasca pa time i na efikasnost fermentacije. U tabeli 4.4. su prikazani rezultati analize vodenih i alkoholnih ekstrakata nosača.

Vrednost pH vodenih i alkoholnih ekstrakata PRŠR i SRŠR (5,3) je niža od pH vrednosti vode i etanola (5,9), što upućuje na zaključak da se tokom sterilizacije rastvaraju kisele komponente. Električna provodljivost rastvora je direktno proporcionalna koncentraciji rastvorenih jonizovanih soli (TDS). Merenje električne provodljivosti rastvora na laboratorijskim instrumentima omogućava očitavanje sadržaja rastvorljivih soli (TDS) sa greškom od oko 10%. TDS predstavlja količinu naelektrisanih jona poreklom najčešće iz mineralnih soli ili metala rastvorenih u jedinici zapremine vode. Tu najčešće spadaju katjoni kalcijuma, magnezijuma, natrijuma i olova, kao i anjoni karbonatni, bikarbonatni, hloridni sulfatni i nitratni (Basha i sar., 2008). Koncentracija šećera u vodenom ekstraktu PRŠR i SRŠR je iznosila 69 mg/l i 73 mg/l, dok je u alkoholnom ekstraktu iznosila 113 mg/l i 110 mg/l. Sadržaj azota u vodenom ekstraktu PRŠR i SRŠR je iznosila 7,0 mg/l i 10,5 mg/l, dok je u alkoholnom ekstraktu iznosila 15,4 mg/l i 14,0 mg/l. Poredeći kvalitet vodenih i alkoholnih ekstrakata PRŠR i SRŠR može se zaključiti da prisustvo etanola utiče negativno na rastvaranje soli, dok u isto vreme doprinosi ekstrakciji šećera i azotnih

materija. Niske koncentracije rastvorenih komponenti u vodenim i alkoholnim ekstraktima PRŠR i SRŠR su posledica efikasne ekstrakcije komponenti iz rezanaca u fabrici šećera.

Tabela 4.4. Analiza vodenih i alkoholnih ekstrakata 10 g suve mase PRŠR, SRŠR i PTSK.

Nosač	Medium za ekstrakciju	pH	TDS (mg/l)	Provodljivost (μS/cm)	Šećer (mg/l)	Azot (mg/l)	Proteini po Kjeldah-u N x 6,25 (mg/l)
PRŠR	voda	5,3	111	208	69	7,0	43,8
	10% etanol	5,3	97	177	113	15,4	96,3
SRŠR	voda	5,3	115	210	73	10,5	65,6
	10% etanol	5,3	95	175	110	14,0	87,5
PTSK							
NS 444	voda	6,0	336	631	115	49,0	306,3
	10% etanol	6,4	436	820	107	52,5	328,1
NS 3014	voda	5,8	257	483	1063	35,0	218,8
	10% etanol	5,9	305	573	1411	38,5	240,6
NS 5043	voda	6,2	273	512	229	35,0	218,8
	10% etanol	6,2	282	572	228	35,0	218,8
NS 6010	voda	5,5	242	455	614	31,5	196,9
	10% etanol	5,6	279	523	705	35,0	218,8
NS 6030	voda	5,4	341	638	472	42,0	262,5
	10% etanol	5,3	383	730	916	45,5	284,4
NS 7016	voda	6,7	428	816	169	45,5	284,4
	10% etanol	6,8	623	1168	119	45,5	284,4
Gold Cup	voda	7,6	448	841,73	27	56,0	350,0
	10% etanol	7,3	644	1208,12	43	59,5	371,9

Poređenjem pH vrednosti vodenih i alkoholnih ekstrakata PTSK ispitivanih hibrida i pH vrednosti vode i etanola (5,9), može se zaključiti da PTSK hibrida NS 3014, NS 6010, NS 6030 imaju kiseli, a hibrida NS 444, NS 5043, NS 7016 i Gold Cup alkalni karakter. Vrednosti pH vodenih ekstrakata su bile u opsegu od 5,4 za hibrid NS 6030 do 7,6 za

hibrid Gold Cup, dok su kod alkoholnih ekstrakata bile u opsegu od 5,3 za hibrid NS 6030 do 7,3 za hibrid Gold Cup. Na osnovu pH vrednosti ekstrakata može se zaključiti da prisustvo etanola različito utiče na ekstrakciju kiselih ili baznih komponenti iz PTSK u zavisnosti od primenjenog hibrida.

Sadržaj ukupnih rastvorljivih soli (TDS) u vodenom i alkoholnom ekstraktu je najniži za hibrid NS 6010 (242 mg/l i 279 mg/l), a najviši za hibrid Gold Cup (448 mg/l i 644 mg/l).

U vodenom i alkoholnom ekstraktu PTSK, najniži sadržaj šećera utvrđen je za hibrid Gold Cup (27 mg/l i 43 mg/l), a najviši za hibrid NS 3014 (1063 mg/l i 1441 mg/l). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da nakon sazrevanja kukuruza najmanje šećera preostaje u stablu kukuruza šećerca.

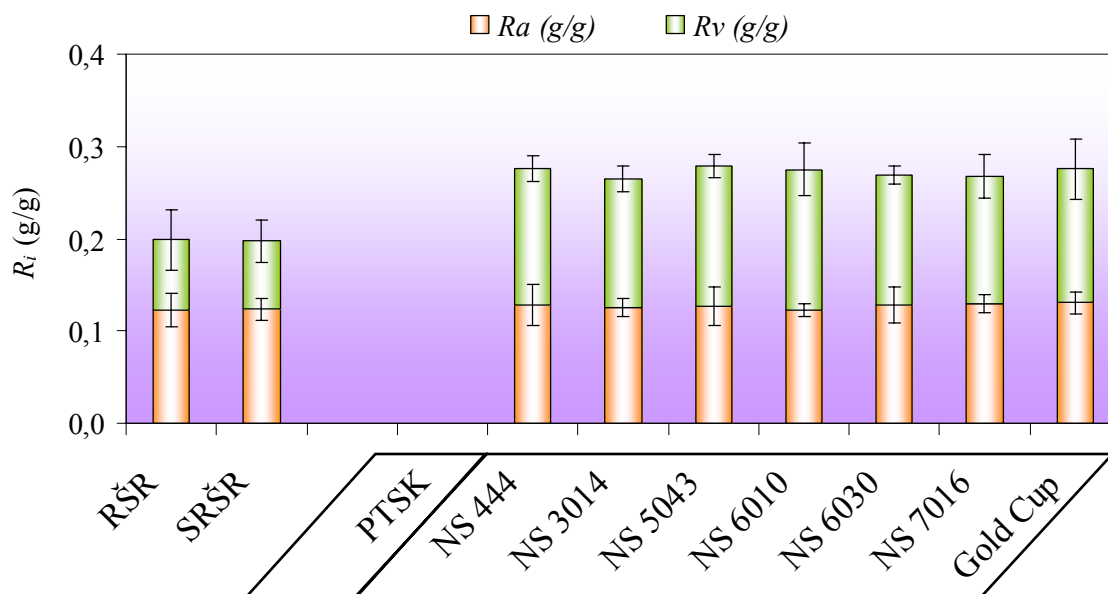
Sadržaj azota u vodenim ekstraktima PTSK je bio u opsegu od 31,5 mg/l za hibrid NS 6010 do 56,0 mg/l za hibrid Gold Cup, što odgovara sadržaju proteina od 196,9 mg/l odnosno 350 mg/l. Sadržaj azota i proteina u vodenim i alkoholnim ekstraktima je za neke hibride bio jednak, dok je kod pojedinih hibrida u alkoholnom ekstraktu sadržaj azota i proteina bio nešto viši nego u vodenom ekstraktu. Najviši sadržaj rastvorenog azota i proteina utvrđen je u alkoholnom ekstraktu PTSK hibrida Gold Cup i iznosio je 59,5 mg/l i 371,9 mg/l. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se iz jednog grama PTSK rastvori od 3,15-5,93 mg azota, odnosno 19,69-37,19 mg proteina, što grubo posmatrano čini oko 10% azota odnosno proteina prisutnih u PTSK. Sadržaj ukupnih rastvorljivih soli, i sadržaj ekstrahovanog šećera je viši u alkoholnom nego u vodenom ekstraktu, pa se može zaključiti da usled povećanja sadržaja etanola, tokom fermentacije, može doći do intenzivnije ekstrakcije soli, mineralnih materija i šećera iz nosača.

Dakle, analizom ekstrakata je ustanovljeno da PTSK u zavisnosti od hibrida sadrži određenu količinu rastvorljivih šećera, mineralnih materija, soli i proteina koje bi potencijalno mogle imati stimulatívno dejstvo na metabolizam imobilisanih ćelija kvasca, dok PRŠR i SRŠR sadrže izrazito manje količine ovih komponenti.

4.1.3. Imobilizacioni potencijal PRŠR, SRŠR i PTSK

Prema brojnim navodima različitih autora, imobilizacija ćelija kvasca na nerastvornim nosačima je uvek rezultat dejstva fizičke adsorpcije usled elektrostatičkih sila i kovalentnih veza između komponenti ćelijskog zida i nosača, dejstva van der Waals-ovih interakcija i dejstva kapilarnih sila (Fujii i sar., 1999; Tsakiris i sar., 2004; Santos i sar., 2008). Debljina filma imobilisanih ćelija kvasca može biti i do 1 mm. Obzirom da ne postoje barijere između ćelija kvasca i fermentacione tečnosti jačina veze ćelija i nosača kao i debljina filma ćelija na nosaču varira i ne može se sa sigurnošću utvrditi usled desorpcije i dislokacije ćelija (Santos i sar., 2008).

U eksperimentima je ispitan potencijal PRŠR, SRŠR i PTSK da imobilišu ćelije *S. cerevisiae* (DTN) u sintetskom glukoznom medijumu uz dodatak odgovarajućih hranljivih materija. Na ovaj način je omogućeno da u primarnoj fazi imobilizacije ćelije kvasca ispune pore nosača, a zatim se adsorbuju fizičko-hemijskim interakcijama na površinu, dok je u sekundarnoj fazi omogućeno umnožavanje adsorbovanih ćelija kvasca koje ostaju zadržane kapilarnim silama unutar porozne strukture nosača. Po završetku imobilizacije gravimetrijski je određena količina imobilisanih ćelija kvasca (adsorbovanih i vezanih kapilarnim silama) na PRŠR, SRŠR i PTSK, a zatim su izračunati parametri imobilizacije (R_i , R_a , R_v , Y_i , Y_a , Y_v). Posmatranjem rezultata stepena imobilizacije R_i , stepena adsorpcije R_a i stepena vezivanja ćelija kapilarnim silama R_v na ispitivanim nosačima (Slika 4.1.), stiče se uvid u mehanizam imobilizacije ćelija i imobilizacioni kapacitet PRŠR, SRŠR i PTSK.



Slika 4.1. Stepen imobilizacije R_i , stepen adsorpcije R_a i stepen vezivanja ćelija kvasca kapilarnim silama R_v na PRŠR, SRŠR i PTSK.

Stepen imobilizacije R_i za PRŠR i SRŠR iznosi $0,199 \pm 0,033$ g/g i $0,197 \pm 0,023$ g/g, i značajno je niži ($p < 0,05$) u poređenju sa stepenom imobilizacije za PTSK koji je u opsegu od $0,265 \pm 0,014$ g/g za hibrid NS 3014 do $0,279 \pm 0,013$ g/g za hibrid NS 5034. Na osnovu sličnih vrednosti R_i ($p > 0,05$) može se zaključiti da PTSK ispitivanih hibrida ima približno jednak kapacitet imobilizacije, te da imobilizacioni kapacitet PTSK ne zavisi značajno od hibrida. Stepen adsorpcije kvasca (R_a) na PRŠR ($0,123 \pm 0,018$ g/g) i SRŠR ($0,124 \pm 0,012$ g/g) se ne razlikuje značajno kako međusobno tako i u poređenju sa PTSK ispitivanih hibrida. Vrednost R_a za PTSK je bila u opsegu od $0,123 \pm 0,007$ g/g za hibrid NS 6010 do $0,131 \pm 0,012$ g/g za hibrid Gold Cup. Stepen vezivanja ćelija kapilarnim silama R_v na PRŠR ($0,077 \pm 0,018$ g/g) i SRŠR ($0,073 \pm 0,012$ g/g) je gotovo dvostruko niži od vrednosti ostvarenih za PTSK koje su bile u opsegu od $0,137 \pm 0,010$ g/g, za hibrid NS 7016 do $0,152 \pm 0,021$ g/g, za hibrid NS 5043. Dvostruko niže vrednosti stepena vezivanja ćelija PRŠR i SRŠR u poređenju sa PTSK su u saglasnosti sa dvostruko nižim vrednostima stepena hidratacije (Tabela 4.3.), pa se može zaključiti da kapacitet vezivanja ćelija kapilarnim silama zavisi od hidrofilitnosti primenjenog nosača. Prilikom primene imobilisanih ćelija kvasca u fermentacionim sistemima poželjno je sprečiti ispiranje i desorpciju ćelija sa nosača (Bai i sar., 2009). U tom smislu stepen adsorpcije kvasca (R_a) je više značajan pokazatelj efikasnosti nosača za imobilizaciju od stepena vezivanja ćelija kapilarnim silama. Na osnovu ostvarenog stepena adsorpcije može se zaključiti da su PRŠR, SRŠR i PTSK svih hibrida podjednako efikasni nosači za imobilizaciju ćelija kvasca.

Rezultati efikasnosti imobilizacije Y_i , efikasnosti adsorpcije Y_a i efikasnosti zadržavanja ćelija kvasca kapilarnim silama Y_v su prikazani u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Efikasnost imobilizacije Y_i , efikasnost adsorpcije Y_a i efikasnost zadržavanja ćelija kvasca kapilarnim silama Y_v na PRŠR, SRŠR i PTSK.

Nosač	Efikasnost imobilizacije kvasca Y_i (%)	Efikasnost adsorpcije kvasca Y_a (%)	Efikasnost vezivanja kvasca kapilarnim silama Y_v (%)
PRŠR	36,7 ± 4,7	61,7 ± 1,3	38,3 ± 1,3
SRŠR	35,9 ± 4,2	62,8 ± 1,2	37,2 ± 1,2
PTSK			
NS 444	45,3 ± 2,3	46,2 ± 5,8	53,8 ± 5,8
NS 3014	45,0 ± 1,6	47,2 ± 1,2	52,8 ± 1,2
NS 5043	44,1 ± 1,9	45,3 ± 5,5	54,7 ± 5,5
NS 6010	47,3 ± 3,0	44,8 ± 2,0	55,2 ± 2,0
NS 6030	43,0 ± 0,9	47,4 ± 5,6	52,6 ± 5,6
NS 7016	44,3 ± 3,3	48,6 ± 0,7	51,4 ± 0,7
Gold Cup	44,9 ± 4,9	47,5 ± 1,2	52,5 ± 1,2

Na osnovu vrednosti Y_i može se zaključiti da je primenjenim postupkom imobilizacije na PRŠR i SRŠR imobilisano oko 36,7%, odnosno oko 35,9% od ukupne količine prisutnih ćelija, dok je na PTSK imobilisano od 43,0% kvasca za hibrid NS 6030 do 47,3% za hibrid NS 6010. Posmatranjem vrednosti Y_a i Y_v može se uočiti da je u slučaju PRŠR i SRŠR adsorbovano 61,7%, odnosno 62,8% imobilisanih ćelija kvasca, dok je kapilarnim silama vezano 38,3% odnosno 37,2% imobilisanih ćelija kvasca. U slučaju PTSK je približno polovina imobilisanih ćelija kvasca čvrsto adsorbovana fizičko-hemijskim interakcijama na samoj površini nosača, dok je druga polovina vezana u poroznoj strukturi kapilarnim silama i može biti isprana sa nosača u uslovima turbulentnog strujanja supstrata.

Analizom fizičkih osobina hidratisanih PRŠR i SRŠR, kao i analizom imobilizacionog i adsorpcionog kapaciteta ovih nosača utvrđeno je da imaju veoma slične karakteristike. Međutim, analizom fizičko-hemijskih osobina sirovih materijala utvrđeno da su SRŠR značajno stabilniji materijal koji je manje podložan mikrobiološkoj kontaminaciji. Pored navedenog manipulacija ovim suvim materijalom u eksperimentima je znatno jednostavnija. Uzimajući u obzir višu srednju vrednost stepena adsorpcije kvasca ($0,124 \pm 0,012$ g/g) i jednostavnost primene ovog materijala, SRŠR su primenjeni u daljim istraživanjima kao nosači za imobilizaciju ćelija kvasca u alkoholnoj fermentaciji.

Zahvaljujući najvišoj srednjoj vrednosti stepena adsorpcije kvasca ($0,131 \pm 0,012$ g/g) i stepena hidratacije ($28,04 \pm 0,08$ g/g) od svih ispitivanih hibrida, PTSK hibrida Gold Cup je izabrano kao najpogodniji nosač za imobilizaciju ćelija kvasca i dalje je detaljno ispitan i primenjen u fermentacionim eksperimentima.

4.1.4. Adsorpcione karakteristike PRŠR, SRŠR i PTSK

Kao što je dobro poznato ćelijski zid *S. cerevisiae* je pretežno negativno naelektrisan usled prisustva velikog broja kiselih grupa, uglavnom karboksilnih, koje su u optimalnim uslovima pH za kvasac uglavnom negativno naelektrisane (Santos i sar., 2008). Adsorpcija ćelija *S. cerevisiae* zavisi od elektrostatičkih interakcija između površine nosača za imobilizaciju i negativno naelektrisane površine ćelije kvasca (Vergnault i sar., 2007). Za efikasnu adsorpciju ćelija *S. cerevisiae* poželjno je da nosač za imobilizaciju bude pozitivno naelektrisan (Fujii i sar. 1999). Površina PRŠR je heterogena sa pozitivno i negativno naelektrisanim aktivnim centrima. Zahvaljujući ovoj osobini PRŠR su u literaturi korišćeni kao efikasan adsorbent kako za pozitivne jone kadmijuma i olova (Pehlivan i sar., 2008) tako i za anjonsku boju Gremazol plavo (Aksu i Isoglu, 2006). U raspoloživoj literaturi se nema podataka o adsorpcionim osobinama, strukturi i naelektrisanju površine PTSK. Međutim, dobro je poznato da i PRŠR i PTSK u velikoj meri sadrže određenu količinu pektinskih materija i proteina. Pektini i proteini imaju izražena jonoizmenjivačka svojstva zahvaljujući prisustvu brojnih polarnih grupa makromolekula (Šušić i sar., 1994). Na osnovu ovih saznanja se može očekivati da oba materijala imaju dobra adsorpciona svojstva.

Kako bi se detaljno ispitale adsorpcione karakteristike primenjenih nosača i uporedio elektrostatički karakter površine, pa time i afinitet odnosno sklonost ovih materijala da adsorbuju pozitivno ili negativno naelektrisane čestice kao preduslov za adheziju ćelija kvasca na odgovarajuće aktivne centre, u ovom radu je analizirana adsorpcija katjonskih i anjonskih boja na PRŠR, SRŠR i PTSK. Takođe je ispitan uticaj različitih uslova (vreme kontakta, koncentracija adsorbata i pH) na proces adsorpcije i adsorpcione karakteristike nosača.

Adsorpcioni eksperimenti su pokazali da PRŠR i SRŠR imaju isti kapacitet adsorpcije primenjenih boja (MP, AO i ECT) i da nema značajne razlike u kinetici adsorpcije, pa su stoga u radu prikazani samo rezultati adsorpcije na SRŠR. Povećanjem inicijalne koncentracije ispitivanih boja (MP, AO i ECT) povećale su se vrednosti q_e usled većeg gradijenta koncentracije tj. adsorbovana je veća količina boje po jedinici mase adsorbenta za sve ispitivane vrednosti pH. Proces adsorpcije boje se odvijao uspešno i veoma brzo. U svim eksperimentima je već nakon 15 minuta, iz rastvora uklonjeno preko 90% boje, dok je potpuna ravnoteža postignuta za najduže 120 minuta, što upućuje na zaključak da se adsorpcija boja odvijala uglavnom samo na površini nosača. Povećanjem količine adsorbenta ostvareno je efikasnije uklanjanje svih ispitivanih boja iz rastvora.

Adsorpcione izoterme definišu distribuciju adsorbata pri ravnoteži, tj. količinu adsorbata adsorbovanu na jedinici mase adsorbenta, q_e , pri ravnotežnoj koncentraciji adsorbata u rastvoru, C_e . Korišćenjem podataka dobijenih na 25°C, za rastvore boja MP, AO i ECT-a početne koncentracije 20-50 mg/l, pH vrednosti 2-8, dobijene su adsorpcione izoterme, koje predstavljaju osnov za projektovanje sistema adsorpcije. Dobijeni ravnotežni podaci su upotrebljeni za modelovanje Freundlich-ove, Langmuir-ove i Temkin-ove adsorpcione izoterme. Konstante ovih izoterma su vrlo korisne za predviđanje parametara adsorpcionog

kapaciteta i dizajna diskontinualnih reaktora (Pehlivan i sar., 2008). Parametri modela izoterme kao i odgovarajući koeficijenti determinacije izračunati na osnovu adsorpcije katjonskih boja MP i AO kao i anjonske boje ECT na adsorbentu SRŠR su prikazani u tabelama 4.6.-4.8. dok su parametri adsorpcije ovih boja na PTSK prikazani u tabelama 4.9.-4.11.

Tabela 4.6. Parametri adsorpcionih izoterme za adsorpciju MP na SRŠR.

Izoterme	Parametri	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8
Freundlich	K_f	0,278	2,342	2,443	2,568	2,777
	$1/n$ (g^{-1})	0,740	0,914	0,946	0,964	0,987
	n (g)	1,352	1,094	1,057	1,038	1,013
	R^2	0,961	0,997	0,991	0,998	0,990
Langmuir	q_m ($mg\ g^{-1}$)	5,79	28,26	37,25	55,56	714,55
	K_a ($l\ mg^{-1}$)	0,037	0,091	0,071	0,049	0,004
	R^2	0,947	0,997	0,994	0,997	0,993
Temkin	K_t ($l\ g^{-1}$)	0,066	7,236	7,556	8,045	9,019
	B ($J\ mol^{-1}$)	1,407	2,814	2,905	2,983	3,080
	R^2	0,915	0,965	0,949	0,968	0,971

Tabela 4.7. Parametri adsorpcionih izoterme za adsorpciju AO na SRŠR.

Izoterme	Parametri	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8
Freundlich	K_f	0,434	1,760	1,713	1,837	2,953
	$1/n$ (g^{-1})	0,652	0,906	0,986	0,972	0,989
	n (g)	1,535	1,104	1,014	1,028	1,011
	R^2	0,978	0,989	0,994	0,995	1,000
Langmuir	q_m ($mg\ g^{-1}$)	5,37	34,60	89,62	144,53	324,58
	K_a ($l\ mg^{-1}$)	0,059	0,053	0,020	0,013	0,009
	R^2	0,964	0,993	0,994	0,996	1,000
Temkin	K_t ($l\ g^{-1}$)	0,154	3,608	3,107	3,650	10,277
	B ($J\ mol^{-1}$)	1,364	2,773	2,998	2,981	3,096
	R^2	0,950	0,980	0,965	0,978	0,984

Tabela 4.8. Parametri adsorpcionih izotermi za adsorpciju ECT na SRŠR.

Izoterme	Parametri	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8
Freundlich	K_f	8,729	5,496	5,439	4,680	4,081
	$1/n$ (g^{-1})	0,881	0,635	0,582	0,595	0,343
	n (g)	1,135	1,575	1,717	1,680	2,914
	R^2	0,995	0,994	0,996	0,997	0,944
Langmuir	q_m ($mg\ g^{-1}$)	188,21	59,39	48,31	46,97	17,87
	K_a ($l\ mg^{-1}$)	0,047	0,069	0,080	0,068	0,094
	R^2	0,993	0,989	0,986	0,986	0,987
Temkin	K_t ($l\ g^{-1}$)	0,732	0,259	0,095	0,192	1,064
	B ($J\ mol^{-1}$)	24,962	14,390	12,488	12,056	3,823
	R^2	0,960	0,981	0,969	0,974	0,956

Tabela 4.9. Parametri adsorpcionih izotermi za adsorpciju MP na PTSK (Gold Cup).

Izoterme	Parametri	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8
Freundlich	K_f	10,114	222,516	216,312	319,955	397,031
	$1/n$ (g^{-1})	0,466	0,782	0,704	0,786	0,844
	n (g)	2,144	1,279	1,420	1,272	1,184
	R^2	0,993	0,981	0,952	0,983	0,980
Langmuir	q_m ($mg\ g^{-1}$)	45,68	135,26	136,89	160,84	299,00
	K_a ($l\ mg^{-1}$)	0,191	3,777	4,729	4,735	2,389
	R^2	0,987	0,990	0,982	0,989	0,991
Temkin	K_t ($l\ g^{-1}$)	0,002	6,920	14,966	18,260	16,005
	B ($J\ mol^{-1}$)	11,577	24,938	23,195	25,445	27,730
	R^2	0,975	0,942	0,974	0,971	0,996

Tabela 4.10. Parametri adsorpcionih izotermi za adsorpciju AO na PTSK (Gold Cup).

Izoterme	Parametri	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8
Freundlich	K_f	9,465	135,077	191,578	241,045	608,075
	$1/n$ (g^{-1})	0,428	0,696	0,832	0,786	0,779
	n (g)	2,335	1,436	1,202	1,272	1,283
	R^2	0,970	0,972	0,999	0,983	0,959
Langmuir	q_m ($mg\ g^{-1}$)	38,30	103,91	172,81	160,61	180,08
	K_a ($l\ mg^{-1}$)	0,211	3,645	1,982	3,310	9,612
	R^2	0,947	0,986	0,998	0,989	0,981
Temkin	K_t ($l\ g^{-1}$)	0,002	3,914	2,632	7,997	127,275
	B ($J\ mol^{-1}$)	10,02	22,24	26,71	25,42	25,56
	R^2	0,923	0,939	0,975	0,971	0,971

Tabela 4.11. Parametri adsorpcionih izoterma za adsorpciju ECT na PTSK (Gold Cup).

Izoterme	Parametri	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8
Freundlich	K_f	8,877	5,649	4,714	4,373	2,646
	$1/n$ (g^{-1})	0,802	0,689	0,680	0,627	0,692
	n (g)	1,246	1,451	1,471	1,594	1,446
	R^2	0,991	0,994	0,994	0,985	0,990
Langmuir	q_m ($mg\ g^{-1}$)	167,01	74,42	68,51	55,32	49,60
	K_a ($l\ mg^{-1}$)	0,049	0,060	0,051	0,052	0,036
	R^2	0,995	0,995	0,996	0,991	0,980
Temkin	K_t ($l\ g^{-1}$)	0,743	0,265	0,051	0,161	0,062
	B ($J\ mol^{-1}$)	22,685	16,529	15,138	12,764	11,944
	R^2	0,998	0,972	0,978	0,975	0,957

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su SRŠR i PTSK efikasni adsorbenti, kako za katjone tako i za anjone. Uzimajući u obzir visoke vrednosti dobijenih koeficijena determinacije i Freundlich-ova i Langmuir-ova izoterma se mogu koristiti kao dobar model za opisivanje adsorpcije MP, ECT i AO na SRŠR i PTSK. Činjenica da adsorpcija odgovara Freundlich-ovoj izoterma ukazuje na to da površina SRŠR i PTSK ima heterogeni karakter i da je adsorpcija molekula boje lokalna. Adsorpcioni rezultati u velikoj meri odgovaraju i Langmuir-ovoj izoterma što potvrđuje da je adsorpcija boja na ovim materijalima dosta složen proces, te da na kraju adsorpcije dolazi do formiranja monosloja na površini SRŠR i PTSK. Usled niskih vrednosti koeficijenta determinacije Temkin-ova jednačina najslabije opisuje eksperimentalne podatke adsorpcione ravnoteže.

Posmatranjem rezultata u tabelama 4.6.-4.11. može se zapaziti da se povećanjem pH vrednosti rastvora povećavaju vrednosti Freundlich-ove (K_f) i Langmuir-ove (q_m) konstante u pogledu kapaciteta adsorpcije katjonskih boja, dok se istovremeno smanjuje kapacitet adsorpcije anjonske boje.

Dakle, adsorpcioni afinitet SRŠR i PTSK prema katjonskim bojama (MP i AO) je snažno izražen na visokim pH vrednostima, a prema anjonskoj boji (ECT) na nižim vrednostima pH. Ovo se može objasniti činjenicom da se hidronijum i hidroksilni joni čvrsto vezuju na površinu adsorbenata, usled čega pri niskim vrednostima pH naelektrisanje adsorbenata postaje pretežno pozitivno naelektrisanje, dok pri visokim pH postaje pretežno negativno naelektrisanje što utiče na adsorpciju boja (Doğan i sar., 2009; Ertaş i sar., 2010). Najviši kapacitet adsorpcije MP i AO po Langmuir-u ostvaren je pri pH 8, i za SRŠR iznosi 714,55 mg/g, odnosno 324,58 mg/g, a za PTSK iznosi 299,00 mg/g, odnosno 180,08 mg/g. Maksimalni kapacitet adsorpcije ECT po Langmuir-u ostvaren je pri pH 2, i u slučaju primene SRŠR iznosi 188,21 mg/g, dok u slučaju primene PTSK iznosi 167,01 mg/g. Nosioци negativnog naelektrisanja na površini SRŠR su uglavom karboksilne grupe, dok su nosioци pozitivnog naelektrisanja kiselinski ostaci (Pehlivan i sar., 2008). Pri vrednosti pH 8, SRŠR su efikasnije adsorbovali katjonske boje, dok su pri pH 2 efikasnije adsorbovali anjonsku boju ETC, u poređenju sa PTSK, te se može zaključiti da je pri pH 2 i pH 8 došlo

do izraženije promene površinskog naelektrisanja SRŠR nego PTSK. Nasuprot ovome, posmatranjem vrednosti q_m za sve tri boje, pri pH 4, 5 i 6 uočava se da je efikasnija adsorpcija svih ispitivanih boja ostvarena primenom PTSK kao adsorbenta nego primenom SRŠR, što se može objasniti prisustvom većeg broja dostupnih funkcionalnih grupa.

Dakle, adsorpcioni afinitet hidratisanih SRŠR i PTSK prema anjonima je najizraženiji pri niskim vrednostima pH. Međutim, pri imobilizaciji ćelija kvasca adsorpcijom kvasca treba imati u vidu da u slučaju opadanja vrednosti pH ispod vrednosti pK_a (konstante disocijacije) karboksilne grupe, alkalne grupe na površini ćelijskog zida postaju više naelektrisane što može izazvati odbijanje ćelija i njihovu desorpciju sa površine nosača (Santos i sar., 2008).

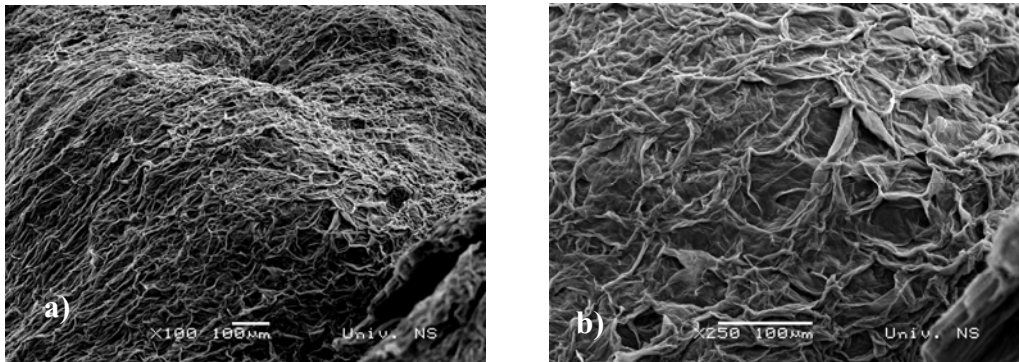
Optimalna vrednost pH za fermentativnu sposobnost ćelija kvasca je u opsegu od 5,0 do 5,5, čemu treba prilagoditi uslove imobilizacije adsorpcijom. Pri pH 5 kapacitet adsorpcije anjonske boje ECT je viši za PTSK (68,51 mg/g) nego za SRŠR (48,31 mg/g). Na osnovu analogije sa adsorpcijom anjonske boje ECT može se zaključiti da pri vrednosti pH 5,0 PTSK ima malo viši kapacitet adsorpcije anjona nego SRŠR, pa je zahvaljujući privlačnim elektrostatičkim silama između negativno naelektrisane površine ćelija kvasca i pozitivno naelektrisanih funkcionalnih grupa nosača, PTSK efikasniji nosač za adsorpciju ćelija kvasca nego SRŠR.

Poređenjem rezultata adsorpcije MP, AO i ECT na SRŠR i PTSK sa drugim adsorbentima prikazanim u literaturi (Bhathagar i sar., 2010, Rafatullah i sar., 2010) može se zaključiti da ovi materijali, pored toga što su efikasni nosači za imobilizaciju ćelija, mogu biti veoma jeftini, perspektivni i veoma efikasni adsorbenti sa potencijalnom primenom u postupku prerade visoko obojenih otpadnih voda iz industrije plastike, tekstila, boja, papira, kozmetike, hrane koje sadrže ove toksične i kancerogene boje i čije ispuštanje u vodotokove može izazvati ozbiljne ekološke probleme.

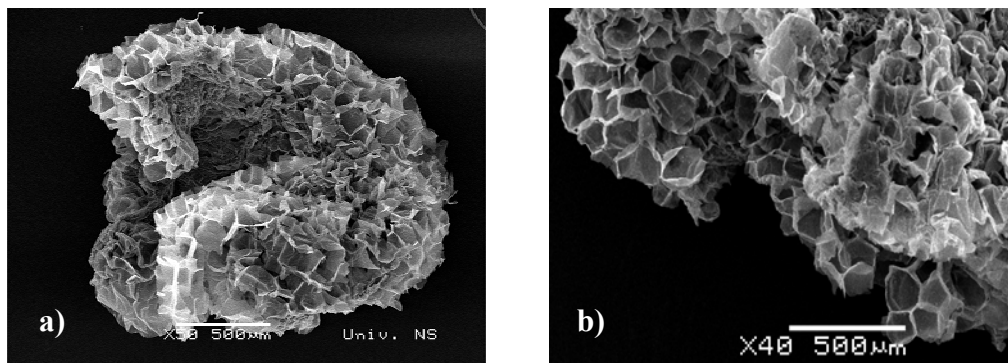
4.1.5. Elektronska (SEM) i optička mikroskopija

Kako bi se stekao uvid u strukturu nosača i vizuelno potvrdila imobilizacija *S. cerevisiae* (DTN) na SRŠR i PTSK (hibrid Gold Cup) preparati nosača su pre i nakon imobilizacije ćelija snimljeni skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) i optičkim mikroskopom. Elektronskom mikroskopijom se stiče detaljan uvid u strukturu površine nosača i prisustvo adsorbovanih ćelija kvasca na samoj površini nosača. Međutim u postupku pripreme nosača za SEM mikroskopiju dolazi do intenzivnog ispiranja ćelija kvasca iz pora nosača, pa stoga nije moguće uočiti ćelije kvasca vezane kapilarnim silama. Optička mikroskopija ja primenjena kako bi se vizuelno utvrdila imobilizacija ćelija kvasca vezivanjem ćelija kapilarnim silama u šupljimama nosača.

Na slici 4.2. su prikazani SEM snimci segmenata SRŠR, a na slici 4.3. SEM snimci strukture PTSK.



Slika 4.2. SEM snimak SRŠR pri uvećanju a) 100 x, b) 250 x.

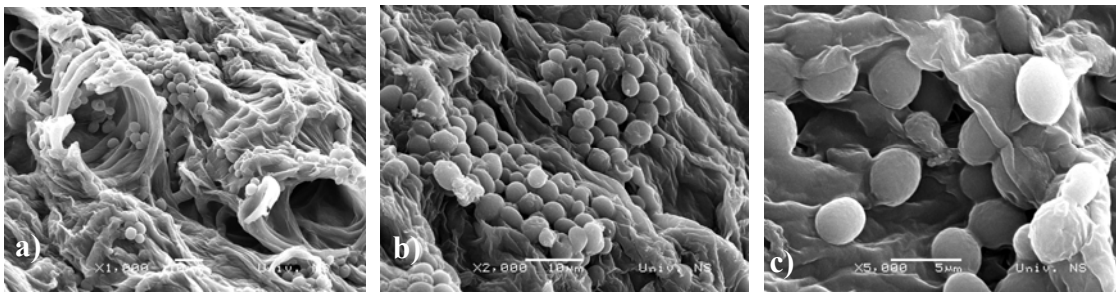


Slika 4.3. SEM snimak PTSK pri uvećanju a) 50 x, b) 40 x.

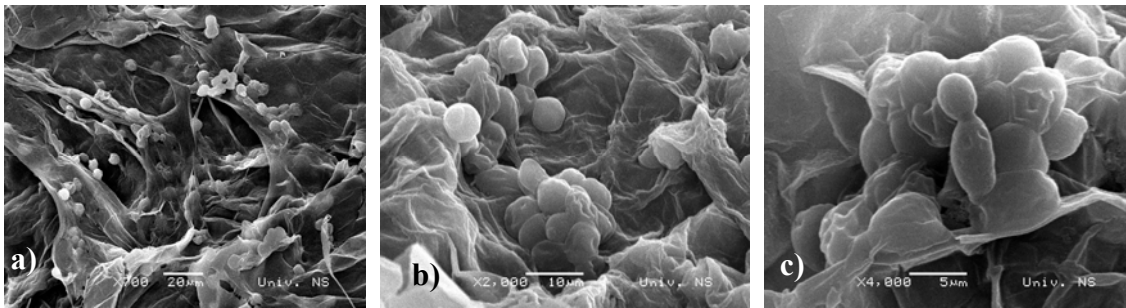
Na osnovu SEM snimaka (Slika 4.2. i 4.3.) može se zaključiti da su SRŠR i PTSK visoko porozni materijali sa brojnim šupljinama koje su najvećim delom parenhimske biljne ćelije šećerne repe i stabla kukruza. Poređenjem dimenzija pora u strukturi SRŠR i PTSK sa mernom skalom za dužinu na snimku, može se uočiti da su dimenzije pora SRŠR približno 40-50 μm, što odgovara dimenzijama parenhimskih ćelija šećerne repe, dok su parenhimske ćelije stabla kukuruza promera oko 100 μm. PTSK ima mikrostrukturu u

obliku pčelinjeg saća i može se uočiti da je rastresitiji materijal od SRŠR. Na osnovu dimenzija pora se može zaključiti da su nosači dovoljno porozni za lak prodor ćelija kvasca u unutrašnjost materijala, a pored toga i efikasan transport supstrata i produkata fermentacije kroz tkivo nosača. Pregledom literature koja se odnosi na istraživanja celuloznih nosača je potvrđeno da su velika specifična površina i prisustvo pora u unutrašnjosti nosača veoma poželjne karakteristike za efikasnu imobilizaciju ćelija kvasca (Fujii i sar., 1999, Bai i sar., 2009). Ćelije kvasca koje su imobilisane u unutrašnjosti strukture ovako poroznih nosača ostaju zaštićene od trenja i ispiranja ali nasuprot tome pri turbulentnom strujanju supstrata može doći do intenzivne desorpcije ćelija imobilisanih na spoljašnjim porama materijala (Phisalaphong i sar., 2007).

Na slikama 4.4. i 4.5. su prikazani SEM snimci površine nosača nakon imobilizacije kvasca na SRŠR i PTSK.



Slika 4.4. SEM snimak SRŠR nakon imobilizacije kvasca pri uvećanju:
a) 1000 x, b) 2000 x i c) 5000 x.

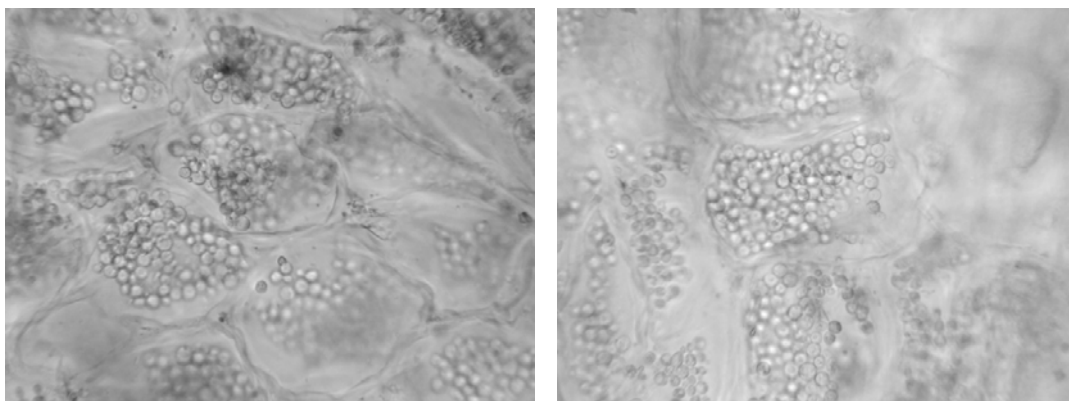


Slika 4.5. SEM snimak PTSK nakon imobilizacije kvasca pri uvećanju:
a) 700 x, b) 2000 x, c) 4000 x.

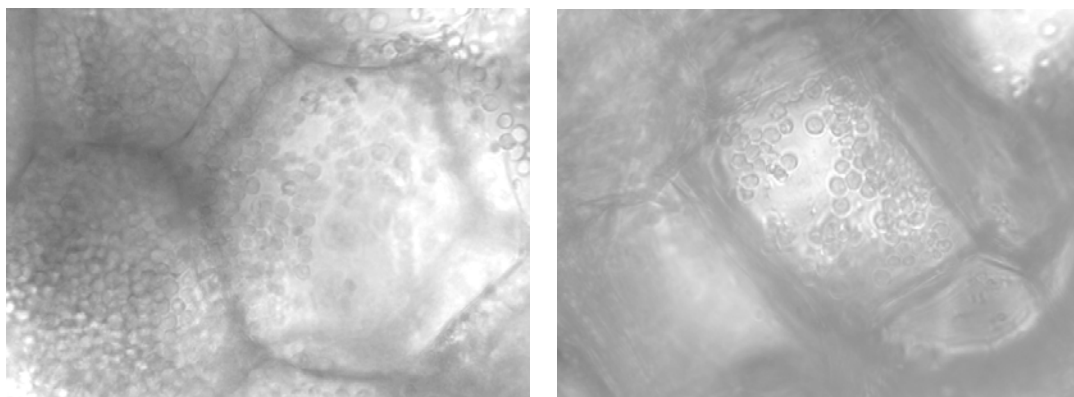
Elektronskom mikroskopskom analizom površine nosača nakon postupka imobilizacije potvrđena je efikasna adsorpcija ćelija kvasca (Slika 4.4. i 4.5.), odnosno prisustvo velikog broja ćelija kvasca, kako na površini spoljnih zidova nosača, tako i unutar parenhimskih i sitastih ćelija sprovodnog tkiva rezanaca šećerne repe i stabla kukuruza, bez vidljivih razlika u količini imobilisanih ćelija. Ćelije kvasca se pod određenim uslovima spontano vezuju na površinu različitih nosača kao i međusobno sekrecijom ekstracelularnih polimera i na taj način formiraju prirodan biofilm (Peinado i sar., 2006). Takođe je uočeno umnožavanje adsorbovanih ćelija kvasca.

Detaljnijim pregledom površine nosača može se uočiti da je na pojedinim segmentima SRŠR i PTSK, jedan deo ćelija ugrađen u strukturu nosača tako da se nalazi ispod same površine nosača i prekriven je tankom opnom nosača. Može se pretpostaviti da je do prodiranja ćelija kvasca ispod površine nosača došlo na izrazito pozitivno naelektrisanim segmentima nosača, koji usled elektrostatičkog afiniteta prekrivaju ćelije kvasca. Takođe se može uočiti da umnožavanje ćelija prekrivenih opnom nosača. Ovo navodi na pretpostavku da su ćelije imobilisane na mehanički fleksibilnim segmentima. Pri tome treba imati u vidu da prilikom imobilizacije prirodnim načinom (adsorpcijom ili flokulacijom) može doći do promene viabilnosti ćelija i metaboličkog stanja, u zavisnosti od same procedure imobilizacije i/ili uticaja nosača (Peinado i sar., 2006).

Mikroskopskim pregledom nativnih preparata nosača pomoću optičkog mikroskopa, nakon imobilizacije (Slika 4.6. i slika 4.7.), utvrđeno je da su pore nosača ispunjene ćelijama kvasca, te da hidratizani SRŠR i PTSK efikasno zadržavaju ćelije unutar pora nosača kapilarnim silama. Takođe se može uočiti da su parenhimske ćelije SRŠR dvostruko manjih dimenzija od parenhimskih ćelija PTSK.



Slika 4.6. Optički mikroskopski snimak SRŠR nakon imobilizacije kvasca (400 x).



Slika 4.7. Optički snimak PTSK nakon imobilizacije kvasca (400 x).

4.2. Alkoholna fermentacija melase i gustog soka pomoću imobilisanih ćelija kvasca

4.2.1. Analiza melase i gustog soka šećerne repe

Melasa šećerne repe je najčešće korišćena šećerna sirovina za proizvodnju etanola u Evropskim zemljama (Cardona i Sanchez, 2007). U Srbiji, a posebno u Vojvodini se melasa tradicionalno koristi za proizvodnju bioetanola pri čemu se u novije vreme oko 90% etanola proizvodi iz ove sirovine. Primena gustog soka kao intermedijernog proizvoda prerade šećerne repe kao sirovine u alkoholnoj fermentaciji pomoću slobodnih ćelija *S. cerevisiae* ima brojnih prednosti u odnosu na melasu, kao što su: ušteda procesne vode, ušteda u procesu prerade otpadnih voda, lakše mešanje i transport, ušteda kiselina za podešavanje pH i viši sadržaj hranljivih materija (Dodić i sar., 2009a).

Fizičko-hemijski parametri kvaliteta melase i gustog soka šećerne repe su prikazani u tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Fizičko-hemijski parametri kvaliteta melase i gustog soka šećerne repe.

Parametar	Melasa	Gusti sok
Bg ^o (17,5°C)	85	64
pH	7,15	8,55
Boja (EBC)	8,5	0,5
Suva masa (% m/m)	85,79 ± 0,58	64,32 ± 0,19
Ukupni šećer (% m/m)	53,14 ± 0,13	59,35 ± 1,00
Saharoza (% m/m)	50,58 ± 0,48	57,86 ± 0,88
Kvocijent čistoće (%)	58,96 ± 0,16	89,95 ± 1,11
Ukupni azot (% m/m)	1,80 ± 0,03	1,18 ± 0,04
Proteini po Kjeldahl-u		
N x 6,25 (% m/m)	11,25 ± 0,18	7,34 ± 0,22
Aminoazot (% m/m)	0,32 ± 0,09	0,24 ± 0,06
Pepeo (% m/m)	7,86 ± 0,71	2,00 ± 0,28

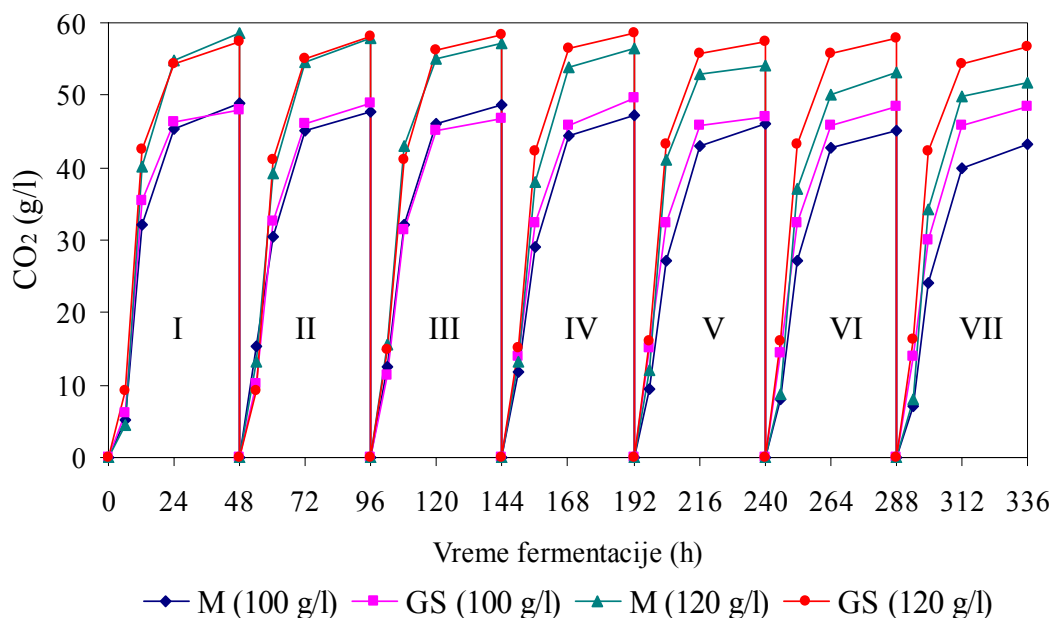
Sadržaj suve mase određen po Balingu je izrazito viši u melasi (85 Bg^o) nego u gustom soku (64 Bg^o). Sadržaj suve mase određen sušenjem je takođe izrazito viši ($p < 0,05$) u melasi (85,79% m/m) u poređenju sa gustim sokom (64,32% m/m), te je i viskozitet viši u melasi poređenju sa gustim sokom. Samim tim je za razblaženje melase prilikom pripreme podloge za fermentaciju potrebna veća količina procesne vode i značajno više energije za mešanje, u poređenju sa gustim sokom. Iako melasa ima nižu vrednost pH (7,15) od gustog soka (8,55), prilikom podešavanja vrednosti pH podloga za fermentaciju na optimalnu vrednost za kvasac (5,5) neophodno je dodati značajno veću količinu kiselina nego za

pripremu podloga na bazi gustog soka, usled pufernog karaktera melase što u određenoj meri poskupljuje proces. Komponente boje u melasi i gustom soku nastaju kao rezultat hemijskih reakcija u procesu prerade šećerne repe. Najznačajnije komponente boje se mogu klasifikovati u tri osnovne grupe: (a) melanini (b) melanoidini i (c) karamel (Kearsley i Dziedzic, 1995). Boja analiziranih rastvora (1 g/l) melase i gustog soka šećerne repe je iznosila 0,5 EBC i 8,5 EBC jedinica, pa se može zaključiti da je koncentracija bojenih komponenti u melasi značajno viša u poređenju sa gustim sokom. U proizvodnji etanola, obojene komponente iz fermentisanih podloga nakon destilacije ostaju u otpadnim vodama, pa se samim tim primenom melase dobijaju više obojene otpadne vode u poređenju sa gustim sokom. Ovo poskupljuje proces prerade istih. Usled nižeg ($p < 0,05$) sadržaja saharoze u melasi (oko 50,58% m/m) u odnosu na gusti sok (oko 57,86% m/m) iz jedinice mase melase može se proizvesti manja količina etanola nego iz jedinice mase gustog soka. Takođe, prilikom pripreme podloge za fermentaciju potrebna je veća količina melase nego gustog soka. Kvocijent čistoće predstavlja merilo vrednosti kvaliteta melase i gustog soka. Kako je kvocijent čistoće melase (58,96%) značajno niži ($p < 0,05$) u poređenju sa gustim sokom (89,95%), može se zaključiti da je udeo saharoze u suvoj masi melase značajno niži u poređenju sa gustim sokom, dok je udeo nešećera u suvoj masi melase značajno viši nego u gustom soku. Mineralne soli i vitamini iz sirovina kao mikronutricijenti imaju stimulatorni i zaštitni efekat na rast i metabolizam proizvodnog mikroorganizma (Nikolić i sar., 2009). Na osnovu sadržaja pepela, ukupnog azota i amino azota može se zaključiti da obe sirovine sadrže mineralne materije i izvore azota kao neophodne hranljive materije za kvasac, ali je melasa bogatija ovim nešećernim komponentama od gustog soka. Generalnim poređenjem hemijskog sastava melase i gustog soka može se zaključiti da melasa sadrži značajno veću količinu nešećernih komponenti i vode od gustog soka. Melasa i gusti sok šećerne repe na osnovu hemijskog sastava predstavljaju pogodne sirovine za proizvodnju etanola, ali je gusti sok potencijalno bolja sirovina za proizvodnju etanola od melase šećerne repe zahvaljujući višem sadržaju fermentabilnih šećera, višem kvocijentu čistoće, nižem viskozitetu i nižoj koncentraciji bojenih komponenti.

4.2.2. Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR

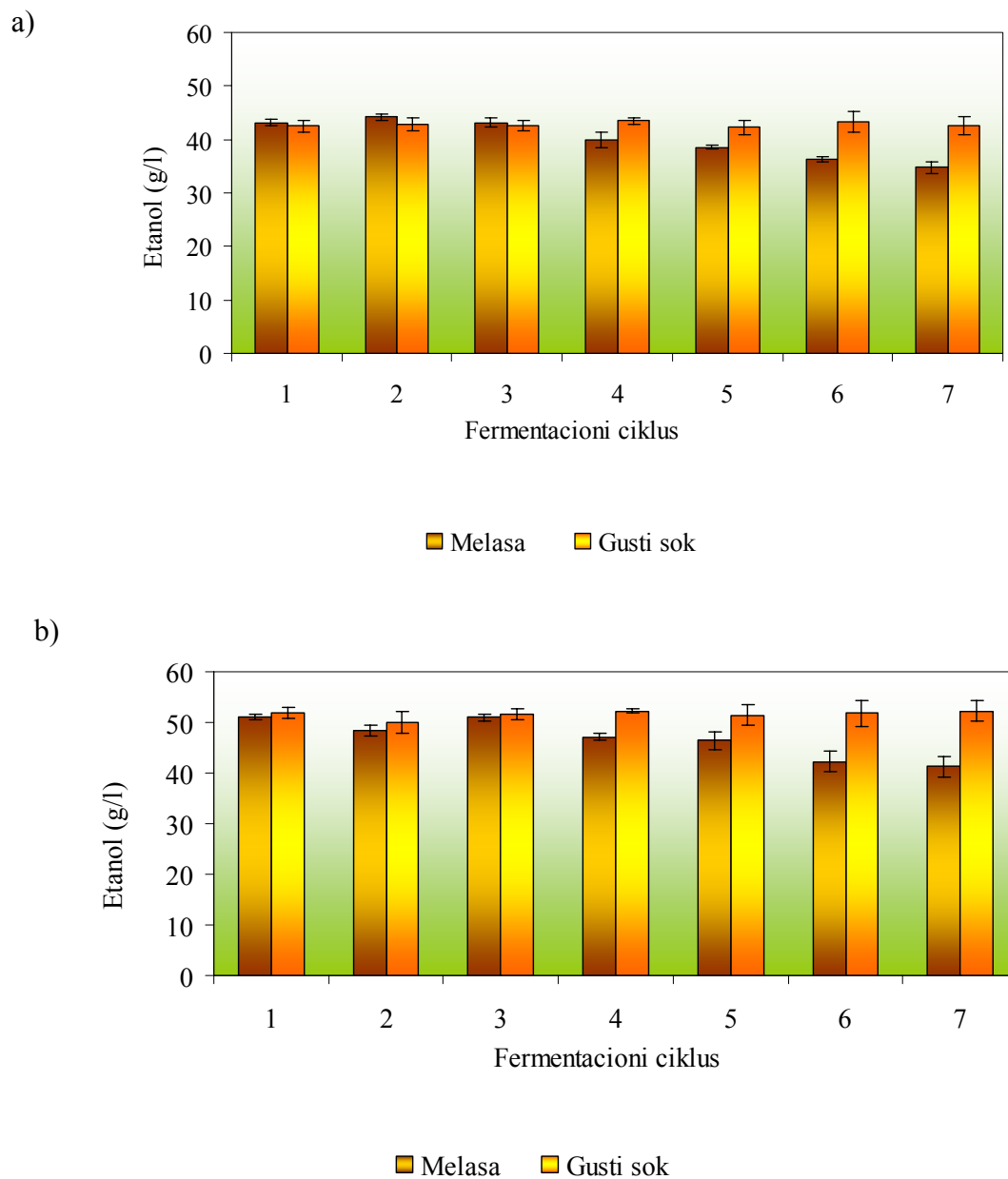
U fermentacionim eksperimentima je ispitan potencijal i efikasnost primene imobilisanih ćelija *S. cerevisiae* DTN na suvim rezancima šećerne repe (SRŠR) za sedam uzastopnih diskontinualnih fermentacija melase i gustog soka šećerne repe, početne koncentracije šećera 100 i 120 g/l, sa krajnjim ciljem da se ispita potencijal primene istog u kontinualnom postupku fermentacije. Pored toga ispitan je i uticaj veće koncentracije šećera u podlozi (150 i 180 g/l) na parametre fermentacije, sa ciljem povećanja efikasnosti eksploatacije intermedijernih proizvoda (gustog soka) i nusproizvoda (rezanaca i melase) procesa prerade šećerne repe uz povećanje prinosa etanola i smanjenje proizvodnih troškova. Poznato je da se kvasac koristi kao visoko kvalitetni proteinsko-vitaminski dodatak u stočnoj ishrani, dok se rezanci šećerne repe takođe koriste za stočnu ishranu. U tom smislu je nakon fermentacije izvršena analiza sadržaja proteina iskorišćenog imobilisanog biokatalizatora na nosaču u cilju procene njegove dalje upotrebe u stočnoj ishrani.

Posmatranjem dinamike izdvajanja CO₂ (Slika 4.8.) tokom sedam uzastopnih fermentacija melase i gustog soka početne koncentracije šećera 100 i 120 g/l, može se uočiti da je tokom prvih 6 h prve fermentacije (I) proizvedena relativno mala količina CO₂. Ovo može biti posledica adaptacije ćelija kvasca na ispitivanu podlogu za fermentaciju. Dalje, u ponovljenim ciklusima fermentacije od II do VII nije uočena potreba za adaptacijom ćelija, jer su ćelije kvasca već priviknute na podlogu. U ponovljenim fermentacijama (II-VII) masa izdvojenog CO₂ naglo raste u prvih 24 h i izdvoji se preko 92% od ukupno nastalog CO₂, nakon čega se izdvajanje CO₂ usporava do završetka ciklusa. Kako se tokom fermentacije CO₂ izdvaja veoma brzo, može se zaključiti da je ostvaren dobar kontakt između imobilisanih ćelija kvasca i supstrata i omogućen efikasan transport supstrata i produkata kroz nosač. Dinamika izdvajanja CO₂ tokom ponovljenih fermentacija melase i gustog soka je veoma slična ali se zapaža da nakon treće ponovljene fermentacije melase, brzina izdvajanja CO₂ postepeno opada, kao i da se u određenoj meri smanjuje krajnja količina izdvojenog CO₂.



Slika 4.8. Izdvajanje CO₂ tokom sedam ponovljenih ciklusa fermentacije melase (M) i gustog soka (GS), početne koncentracije šećera 100 i 120 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR.

Na slici 4.9. (a i b) su prikazane vrednosti koncentracije etanola ostvarene nakon sedam uzastopnih ciklusa fermentacije pomoću ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR. U prva tri ciklusa fermentacije melase, početne koncentracije šećera (100 i 120 g/l), nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u koncentraciji etanola, a zatim se uočava značajno ($p < 0,05$) smanjenje koncentracije etanola sa $43,16 \pm 0,78$ g/l i $50,97 \pm 0,67$ g/l (treća fermentacija) na $34,73 \pm 1,02$ g/l i $41,25 \pm 2,03$ g/l (sedma fermentacija). Krajnja koncentracija etanola se ne menja značajno ($p > 0,05$) za svih sedam ponovljenih fermentacija gustog soka. Koncentracija etanola ostvarena nakon prve fermentacije gustog soka je iznosila $42,51 \pm 1,05$ g/l i $51,81 \pm 1,04$ g/l, dok je nakon sedme fermentacije iznosila $42,68 \pm 1,68$ g/l i $52,26 \pm 2,00$ g/l, za početne koncentracije šećera u podlozi 100 i 120 g/l.



Slika 4.9. Koncentracija etanola na kraju sedam uzastopnih fermentacija melase i gustog soka, početne koncentracije a) 100 g/l i b) 120 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR.

U tabeli 4.13. su prikazani parametri fermentacije melase i gustog soka. U svakom od sedam uzastopnih ciklusa fermentacije melase i gustog soka, vrednosti stepena konverzije šećera iz podloge (Y_s) su prelazile 95%, što navodi na zaključak da su ćelije utrošile gotovo sav raspoloživi šećer iz podloge (100 i 120 g/l), što dalje sugerise da su ćelije zadržale veoma visoku metaboličku aktivnost tokom sedam uzastopnih fermentacija. U slučaju fermentacije melase konverzija šećera je bila u opsegu 97,9-95,6% i uočava se postepeno

opadanje vrednosti Y_s od četvrte do sedme fermentacije. Konverzija šećera iz podloga na bazi gustog soka, za obe početne koncentracije šećera, je tokom svih sedam fermentacija bila u opsegu 97,3%-97,8%. Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima prema kojima ćelije kvasca imobilisane na različitim biljnim materijalima imaju sposobnost da efikasno usvajaju šećere kako iz melase tako i iz voćnih supstrata (Plessas i sar., 2007).

Tabela 4.13. Parametri fermentacije melase i gustog soka šećerne repe (100 i 120 g/l šećera) primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR.

Sirovina	Ciklus	Početni šećer S_o (g/l)	Stepen konverzije šećera Y_s (%)	Produktivnost etanola Q_p (g/lh)	Prinos etanola na usvojeni šećer $Y_{p/s}$ (g/g)	Efikasnost fermentacije $E_{p/s}$ (%)
Melasa	1	100	97,1	0,90 ± 0,01	0,444 ± 0,007	87,0
	2	100	97,2	0,92 ± 0,01	0,456 ± 0,007	89,2
	3	100	97,0	0,90 ± 0,02	0,445 ± 0,008	87,1
	4	100	97,0	0,83 ± 0,03	0,413 ± 0,015	80,7
	5	100	96,5	0,80 ± 0,01	0,400 ± 0,003	78,3
	6	100	95,7	0,75 ± 0,01	0,378 ± 0,005	74,0
	7	100	95,6	0,72 ± 0,02	0,363 ± 0,011	71,1
	1	120	97,9	1,06 ± 0,01	0,435 ± 0,005	85,1
	2	120	97,5	1,01 ± 0,02	0,413 ± 0,010	80,8
	3	120	97,4	1,06 ± 0,01	0,437 ± 0,006	85,5
	4	120	97,4	0,98 ± 0,01	0,404 ± 0,006	79,1
	5	120	97,0	0,97 ± 0,04	0,398 ± 0,015	78,0
	6	120	97,1	0,88 ± 0,04	0,363 ± 0,018	71,0
	7	120	96,9	0,86 ± 0,04	0,355 ± 0,017	69,5
Gusti sok	1	100	97,5	0,89 ± 0,02	0,436 ± 0,011	85,3
	2	100	97,4	0,89 ± 0,02	0,440 ± 0,012	86,0
	3	100	97,8	0,89 ± 0,02	0,436 ± 0,009	85,3
	4	100	97,7	0,90 ± 0,01	0,444 ± 0,006	86,9
	5	100	97,4	0,88 ± 0,03	0,433 ± 0,014	84,8
	6	100	97,3	0,90 ± 0,04	0,444 ± 0,019	86,9
	7	100	97,3	0,89 ± 0,04	0,438 ± 0,017	85,8
	1	120	97,7	1,08 ± 0,02	0,442 ± 0,009	86,4
	2	120	97,7	1,04 ± 0,04	0,426 ± 0,018	83,4
	3	120	97,8	1,08 ± 0,02	0,441 ± 0,009	86,2
	4	120	97,6	1,09 ± 0,01	0,446 ± 0,003	87,2
	5	120	97,8	1,07 ± 0,04	0,439 ± 0,017	85,9
	6	120	97,9	1,08 ± 0,05	0,441 ± 0,021	86,3
	7	120	97,5	1,09 ± 0,04	0,446 ± 0,017	87,3

Rezultati produktivnosti etanola su u saglasnosti sa rezultatima koncentracije etanola. Fermentacije podloga od melase početne koncentracije šećera 100 odnosno 120 g/l, produktivnost etanola je iznosila 0,72-0,92 g/lh odnosno 0,86-1,06 g/lh. Produktivnost etanola kod fermentacije gustog soka je ostala gotovo jednaka ($p > 0,05$), od prve do sedme fermentacije i iznosila je 0,88-0,90 g/lh, odnosno 1,04-1,09 g/lh.

Prinos etanola na usvojeni šećer iz melase opada od treće do sedme fermentacije sa 0,445 g/g na 0,363 g/g i sa 0,437 g/g na 0,355 g/g, za podloge sa početnom koncentracijom šećera 100 i 120 g/l. Ovo navodi na zaključak da pored opadanja sposobnosti usvajanja šećera nakon treće uzastopne fermentacije dolazi i do opadanja fermentacionih sposobnosti kvasca. Prinos etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) iz podloga na bazi gustog soka se statistički ne razlikuje ($p > 0,05$) u ispitanim fermentacijama za obe početne koncentracije šećera (100 i 120 g/l). Vrednosti $Y_{p/s}$ ostvarene fermentacijom gustog soka (100 i 120 g/l) su u opsegu od 0,433 g/g do 0,446 g/g. U skladu sa rezultatima $Y_{p/s}$, vrednosti efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) su u slučaju melase opale nakon treće fermentacije sa 87,1% na 71,1% i sa 85,5 na 69,5% za podloge sa početnim sadržajem šećera 100 i 120 g/l. Efikasnost fermentacije ($E_{p/s}$) gustog soka se nije značajno menjala ($p > 0,05$) od prve do sedme fermentacije i bila je u opsegu 84,8-86,9% i 83,4-87,3% za podloge sa početnim sadržajem šećera 100 g/l i 120 g/l.

Najbolji rezultati fermentacije ostvareni su u sedmoj fermentaciji gustog soka (120 g/l šećera), pri čemu je usvojen sav prisutan šećer (97,5%) i ostvarena je maksimalna koncentracija etanola 52,26 g/l i prinos etanola 0,446 g/g, što čini 87,3 % od teorijskog prinosa. Značajno je istaći da je sa povećanjem broja ciklusa fermentacije melase došlo do promene boje hidratizanih SRŠR sa imobilisanim kvascem iz svetlo krem u tamno smeđu, dok u slučaju fermentacije gustog soka nije uočena značajna promena boje nosača. Kao što je dobro poznato ćelije kvasca se mogu koristiti kao biosorbent za različite katjone, uključujući različite bojene komponente. U osnovne gradivne komponente ćelijskog zida kvasca spadaju polisaharidi koji imaju jonoizmenjivačka svojstva, proteini i lipidi. Heterogena hemijska struktura čini površinu ćelije kvasca bogatom različitim funkcionalnim grupama koje imaju sposobnost da vezuju različite bojene molekule (Aksu i Dönmez, 2003). Analizom adsorpcionih osobina hidratizanih SRŠR u adsorpcionim eksperimentima je utvrđeno da ovaj nosač ima sposobnost da adsorbuje, kako katjonske tako i anjonske boje, pa stoga SRŠR mogu predstavljati efikasan adsorbent za bojene komponente iz šećernih rastvora. Visoka koncentracija bojnih komponenti u rastvoru je osnovni preduslov za intenzivno vezivanje boje kako na površinu nosača tako i na površinu ćelija kvasca. Analizom kvaliteta sirovina je utvrđeno da melasa sadrži 17 puta veću količinu bojnih komponenti (melanini, melanoidini i karamel) i izrazito veću količinu nešećernih materija od gustog soka. Usled ovoga dolazi do izrazito intenzivnije adsorpcije boja na površini nosača i ćelija kvasca u podlogama na bazi melase nego u podlogama na bazi gustog soka. Pojedine nešećerne komponente u podlogama za fermentaciju, pri povišenim koncentracijama, mogu imati stimulativni i zaštitni efekat na ćelije kvasca, dok druge mogu imati inhibitorno dejstvo na metabolizam kvasca, što se može odraziti na efikasnost procesa fermentacije. Količina ovih komponenti zavisi od prirode primenjene sirovine (Nikolić i sar., 2009a). Postepena akumulacija velike količine bojnih komponenti

i drugih nešećera iz melase na površini kvasca i nosača može negativno uticati na sposobnosti usvajanja šećera i fermentativnu aktivnost ćelija kvasca, što za posledicu ima opadanje prinosa i produktivnosti etanola tokom tri poslednje fermentacije.

Na osnovu rezultata fermentacije može se zaključiti da je melasa šećerne repe dobra sirovina za proizvodnju etanola u diskontinualnom postupku, ali se ne može preporučiti kao supstrat za dugotrajnu višestepenu ili kontinualnu fermentaciju primenom imobilisanih ćelija na SRŠR usled visokog sadržaja bojenih komponenti i/ili drugih nešećera koji negativno utiču na metabolizam kvasca. Nasuprot tome, gusti sok ima gotovo optimalni sastav za metabolizam ćelija kvasca, zahvaljujući čemu je omogućena stabilna proizvodnja etanola u višestepenom diskontinualnom postupku fermentacije, bez obogaćivanja hranljivim materijama. Slični rezultati su objavljeni od strane Ogbonna i sar. (2001) gde su za alkoholnu fermentaciju ekstrakcionog soka šećerne repe uspešno upotrebljene ćelije flokulentnog soja kvasca imobilisane na lufa sunderu u tri ponovljene diskontinualne fermentacije uz značajno povećanje koncentracije etanola i prinosa etanola na usvojeni šećer. Međutim, ovaj imobilisani biokatalizator je, takođe, pokazao visoku stabilnost tokom 35 uzastopnih fermentacija melase šećerne repe i 500 h kontinualne fermentacije saharoznog sintetskog medijuma i melase (Ogbonna i sar., 1994).

Koncentracija biomase kvasca kao i parametri imobilizacije utvrđeni nakon treće i sedme fermentacije prikazani su u tabeli 4.14. Stepent imobilizacije ćelija (R_i) na početku prve fermentacije je iznosio $0,182 \pm 0,024$ g/g, a koncentracija imobilisanih ćelija kvasca (X_i) u podlozi nakon inokulacije je iznosila $4,863 \pm 0,641$ g/l. Vrednosti stepena imobilizacije i koncentracije imobilisanih ćelija nakon treće i sedme fermentacije melase i gustog soka su značajno više ($p < 0,05$) od inicijalnih vrednosti pa se može zaključiti da su ćelije kvasca na nosaču zadržale sposobnost rasta i umnožavanja. Pri ovome treba imati u vidu činjenicu da je nakon svake završene fermentacije, fermentisana podloga zamenjena svežom podlogom i pri tome su povremeno obezbeđeni aerobni uslovi. Zahvaljujući ovome su na početku svake nove fermentacije stvoreni povoljni uslovi za umnožavanje imobilisanih ćelija kvasca. Nakon sedam uzastopnih fermentacija melase, vrednost stepena imobilizacije ćelija je iznosila $0,196$ g/g i $0,204$ g/g, a za gusti sok $0,262$ g/g i $0,295$ g/g, za podloge sa početnom koncentracijom šećera 100 i 120 g/l. Na osnovu vrednosti stepena imobilizacije može se zaključiti da ćelije ostaju vezane za nosač čak i nakon sedam ponovljenih fermentacija. Vrednosti R_i i X_i utvrđene nakon treće fermentacije nisu zavisile od ispitivane podloge. Međutim, nakon sedme fermentacije melase utvrđene su značajno niže ($p < 0,05$) vrednosti ovih parametara u poređenju sa gustim sokom. Opadanje vrednosti ovih parametara imobilizacije je u saglasnosti sa akumulacijom bojenih komponenti na površini nosača. Može se pretpostaviti da je usled adsorpcije bojenih komponenti melase na nosač došlo do delimične promene površinskog naelektrisanja nosača i samim tim do desorpcije ćelija kvasca. Koncentracija biomase kvasca (X_i) na kraju fermentacije je zavisila od prirode podloge. Povoljniji uslovi rasta ćelija kvasca u gustom soku u poređenju sa melasom su značajno poboljšali fermentacionu aktivnost ćelija kvasca, što je omogućilo intenzivno usvajanje šećera i postizanje veće koncentracije etanola. Međutim, prema rezultatima efikasnosti imobilizacije (Y_i) može se zaključiti da imobilisane ćelije blago dominiraju u sistemu, ali se približno 40-47% ćelija ipak ispere sa nosača.

Tabela 4.14. Parametri imobilizacije ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR nakon treće i sedme fermentacije melase i gustog soka.

Sirovina	Ciklus	Početni šećer S_o (g/l)	Stepen imobilizacije R_i (g/g)	Koncentracija imobilisanih ćelija X_i (g/l)	Koncentracija ukupnih ćelija X_t (g/l)	Efikasnost imobilizacije Y_i (%)
Melasa	3	100	0,199 ± 0,013	5,31 ± 0,35	10,13 ± 0,22	52,5
	7	100	0,196 ± 0,002	5,24 ± 0,05	9,48 ± 0,12	55,3
	3	120	0,215 ± 0,013	5,76 ± 0,34	10,24 ± 0,85	56,2
	7	120	0,204 ± 0,007	5,45 ± 0,20	9,60 ± 0,08	56,8
Gusti sok	3	100	0,207 ± 0,020	5,54 ± 0,54	10,47 ± 0,89	52,9
	7	100	0,262 ± 0,010	7,01 ± 0,28	11,57 ± 0,06	60,6
	3	120	0,212 ± 0,008	5,68 ± 0,21	10,22 ± 0,51	55,5
	7	120	0,295 ± 0,016	7,87 ± 0,42	12,78 ± 0,51	61,6

Mogućnost uspešne primene ovog biokatalizatora u diskontinualnoj fermentaciji je potvrđena gore prikazanim rezultatima fermentacije. Usled velike količine desorbovanih ćelija i lakog ispiranja ćelija kvasca sa nosača primena ovog biokatalizatora u kontinualnom postupku bi bila moguća uz relativno male protoke. Smanjenje protoka podloge u kontinualnom procesu dovodi do smanjenja produktivnosti procesa. U slučaju primene većih protoka dolazi do intenzivnog ispiranja biokatalizatora sa SRŠR iz reaktora, što zahteva uklanjanje ćelija kvasca iz efluenta filtracijom i/ili centrifugiranjem, a to poskupljuje proces. Takođe, treba imati u vidu da su cena nosača na tržištu, cena postupka imobilizacije i rizici od kontaminacije od ključnog ekonomskog značaja za primenu imobilisanih ćelija kvasca u industrijskoj proizvodnji etanola (Bakoyianis i sar., 1997). Postupak imobilizacije kvasca na SRŠR je jeftin, jednostavan i omogućuje održavanje velike gustine ćelija kvasca. Važno je istaći da su rezanci šećerne repe tokom svih sedam fermentacija zadržali svoj oblik i nije došlo do narušavanja njihove strukture.

Nakon dodatka određenih izvora azota i proteina rezanci šećerne repe se koriste za ishranu stoke (Iconomou i sar., 1995). Pored toga, kvasac se u fabrikama etanola prodaje kao nusproizvod čime se povećava ekonomičnost procesa proizvodnje etanola (Ge i sar., 2006). Obzirom da je dobro poznato da kvasac predstavlja vredan proteinsko-vitaminski dodatak u ishrani stoke, ispitan je sadržaj proteina u sirovim SRŠR, kao i u iskorišćenom imobilisanom biokatalizatoru, nakon sedme fermentacije. Sadržaj proteina sirovih SRŠR iznosio je 8,91% na suhu masu, dok je u iskorišćenom imobilisanom biokatalizatoru bio u opsegu od 10,13-10,65% na suhu masu. Ovi rezultati sugerišu da se iskorišćeni imobilisani biokatalizator potencijalno može upotrebiti kao proteinski dodatak stočnoj ishrani. Na taj način bi se rešio ekološki problem odlaganja velikih količina iskorišćenog biokatalizatora u životnu sredinu. Ovakav pristup pruža još jednu mogućnost za uspešnu proizvodnju

etanola, bez odlaganja otpadnih materija u životnu sredinu, racionalnom upotrebom među i nusproizvoda iz procesa proizvodnje šećera. Prodajom nusproizvoda može se ostvariti od 74% do 21% prihoda od ukupne prodaje procesu proizvodnje etanola iz melase šećerne repe (Maung i Gustavson, 2009).

U cilju povećanja produktivnosti etanola, ispitana je fermentacija melase i gustog soka početne kooncentracije šećera 150 i 180 g/l primenom kvasca imobilisanog na SRŠR. Ostvareni parametri fermentacije su prikazani u tabeli 4.15. U skladu sa očekivanjima, povećanjem sadržaja šećera u podlozi povećava se koncentracija i produktivnost etanola. U prvoj fermentaciji melase početnog sadržaja šećera 150 g/l i 180 g/l ostvarena je prosečna koncentracija etanola 62,01 g/l i 71,07 g/l, što odgovara produktivnosti etanola 1,29 g/lh i 1,48 g/lh. U prvoj fermentaciji gustog soka početnog sadržaja šećera 150 g/l i 180 g/l proizvedeno je 61,76 g/l i 75,15 g/l etanola što odgovara produktivnosti etanola 1,29 g/lh i 1,57 g/lh. Međutim, nasuprot očekivanjima, povećanjem koncentracije šećera u podlogama sa 150 na 180 g/l dolazi do opadanja stepena konverzije šećera, prinosa etanola na usvojeni šećer i efikasnosti fermentacije.

Tabela 4.15. Parametri fermentacije melase i gustog soka šećerne repe, početne koncentracije šećera 150 i 180 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR.

Sirovina	Ciklus	Početni	Konverzija	Koncentracija	Produktivnost	Prinos etanola		Efikasnost fermentacije
		šećer S_o (g/l)	šećera Y_s (%)	etanola P (g/l)	etanola Q_p (g/lh)	na usvojeni šećer $Y_{p/s}$ (g/g)	$E_{p/s}$ (%)	
Melasa	1	150	97,8	62,01 ± 1,55	1,29 ± 0,03	0,423 ± 0,010	82,7	
	2	150	91,9	56,20 ± 1,19	1,17 ± 0,02	0,408 ± 0,006	79,8	
	1	180	95,4	71,07 ± 0,13	1,48 ± 0,00	0,414 ± 0,001	81,0	
	2	180	90,7	56,53 ± 2,29	1,18 ± 0,05	0,346 ± 0,019	67,8	
Gusti sok	1	150	97,7	61,76 ± 0,08	1,29 ± 0,00	0,421 ± 0,002	82,5	
	2	150	94,5	57,85 ± 1,31	1,21 ± 0,03	0,408 ± 0,010	79,9	
	1	180	95,3	75,15 ± 1,28	1,57 ± 0,03	0,438 ± 0,009	85,8	
	2	180	93,0	66,67 ± 4,69	1,39 ± 0,10	0,398 ± 0,030	77,9	

Već u drugoj ponovljenoj fermentaciji za melasu i gusti sok za obe početne koncentracije šećera u supstratu (150 i 180 g/l) ostvarene su značajno niže vrednosti koncentracije etanola ali i svih ostalih parametara fermentacije (Tabela 4.15.). Pri tome je zapaženo da je imobilisani biokatalizator promenio boju u tamno smeđu, već nakon prve fermentacije melase, a takođe je uočena i blaga promena boje imobilisanog biokatalizatora kod fermentacije gustog soka. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da pri visokim koncentracijama šećera u podlozi dolazi do adsorpcije boje i drugih nešećernih komponenti na površinu hidratizanih SRŠR, što negativno utiče na metabolizam imobilisanih ćelija kvasca. To može biti razlog nižih vrednosti parametara fermentacije. Na osnovu prikazanih

rezultata fermentacije melase i gustog soka može se zaključiti da primena ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR nema perspektivu u VHG alkoholnoj fermentaciji.

U tabeli 4.16. su prikazani rezultati vrednosti pH, električne provodljivosti i ukupnih rastvorljivih soli melase i gustog soka različitih koncentracija šećera, pre inokulacije i nakon prve fermentacije, primenom imobilisanih ćelija kvasca na SRŠR.

Tabela 4.16. Vrednost pH, provodljivosti i sadržaja rastvorljivih soli (TDS) podloga na početku i kraju prvog ciklusa fermentacije melase i gustog soka primenom imobilisanih ćelija kvasca na SRŠR.

Sirovina	Početni šećer, S_0 (g/l)	pH	Provodljivost (mS/cm)	Ukupne rastvorljive soli, TDS (g/l)
Melasa	100	5,5-5,0	12,6-18,2	7,92-10,3
	120	5,5-5,2	15,1-20,0	9,5-11,3
	150	5,5-5,4	23,4-26,2	14,3-16,1
	180	5,5-5,4	24,7-28,1	15,2-17,5
Gusti sok	100	5,5-4,5	2,7-3,6	1,4-1,9
	120	5,5-4,6	2,8-3,7	1,5-2,0
	150	5,5-4,7	3,0-4,1	1,5-2,2
	180	5,5-4,7	3,1-4,1	1,6-2,2

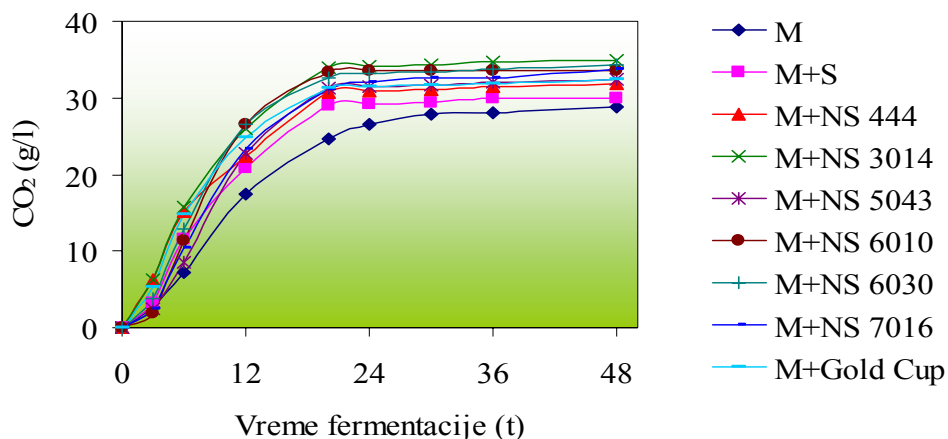
Na osnovu prikazanih rezultata u tabeli 4.16. se može zaključiti da se povećanjem sadržaja šećera u podlozi povećava pH vrednost fermentisanih podloga na bazi melase i gustog soka, pa se može zaključiti da kvasci pri višem sadržaju šećera proizvode manje kiseline. Smanjenje pH vrednosti tokom fermentacije je manje izraženo u melasi nego u gustom soku, što je u saglasnosti sa pufernim svojstvima melase. Električna provodljivost i sadržaj rastvorljivih soli su viši na kraju nego na početku fermentacije. Logično je da se povećanjem sadržaja šećera odnosno supstrata u podlozi povećava i sadržaj rastvorljivih soli. Pri tome je u podlogama na bazi melase, istog početnog sadržaja šećera utvrđena značajno viša koncentracija rastvorljivih soli, nego u gustom soku. Tokom fermentacije u podlogama od melase dolazi do intenzivnijeg porasta sadržaja rastvorljivih soli, nego u podlogama od gustog soka. Ovo može biti posledica odumiranja odnosno liziranja većeg broja ćelija kvasca. Rezultati su u skladu sa rezultatima sadržaja pepela u sirovinama. Kako je sadržaj rastvorljivih soli u podlogama od melase izrazito viši nego u podlogama od gustog soka, odnosno veći gradijent koncentracije može usloviti intenzivniju adsorpciju ovih soli na nosač, i značajno uticati na parametre fermentacije i imobilizacije.

Da bi se utvrdila ekonomska isplativost procesa proizvodnje etanola pomoću ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR neophoda je optimizacija uslova i statistička procena fermentacije u industrijskim srazmerama, kao i detaljna ekonomska analiza. Razvoj podloga za fermentaciju na bazi industrijskih sirovina je ekonomski poželjan. U svetlu veoma brzog porasta ekonomske cene goriva na svetskom tržištu, proizvodnja etanola kao biogoriva iz melase i/ili gustog soka primenom imobilisanog biokatalizatora na rezancima šećerne repe može biti ekonomski opravdana mogućnost povećanja efikasnosti fabrike šećera kombinovanjem proizvodnje šećera i etanola.

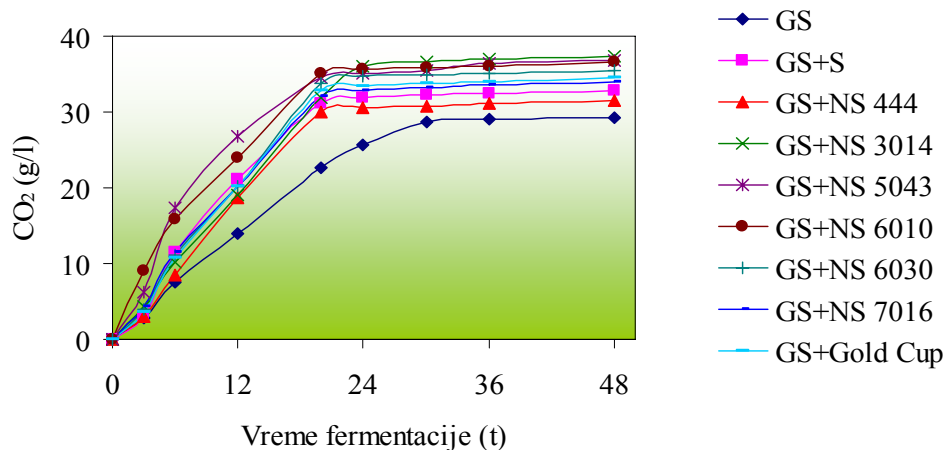
4.2.3. Uticaj dodatka PTSK različitih hibrida na fermentaciju melase i gustog soka pomoću slobodnih ćelija kvasca

Kako bi se ispitao uticaj rastvorljivih komponenti PTSK na fermentaciju melase i gustog soka početnog sadržaja šećera 150 g/l pomoću slobodnih ćelija svežeg pekarskog kvasca postavljena je fermentacija podloga bez dodataka, uz dodatak 1 g/l KH_2PO_4 i 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kao izvora hranljivih materija, kao i uz dodatak 10 g/l mliva PTSK svakog ispitivanog hibrida. Podloge za fermentaciju bez dodatka PTSK ili mineralnih soli su upotrebene kao kontrola. Početna koncentracija kvasca bila $1 \pm 0,1 \times 10^8$ ćelija kvasca/l podloge. Praćenjem izdvojenog CO_2 tokom fermentacije melase (Slika 4.10.a) i gustog soka (Slika 4.10.b) utvrđeno je da je alkoholna fermentacija podloga od melase i gustog soka sa dodatkom soli kao hranljivih materija (S) i sa dodatkom PTSK svih hibrida trajala je 20 h, dok je fermentacija podloga bez dodataka trajala 30 h.

a)

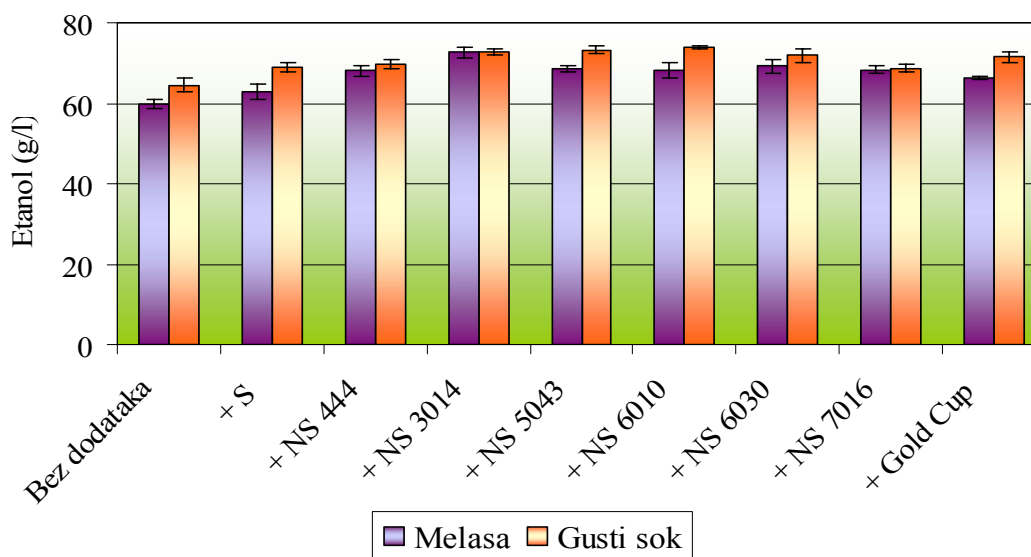


b)



Slika 4.10. Izdvajanje CO_2 tokom fermentacije a) melase (M) i b) gustog soka (G) sa početnim sadržajem šećera 150 g/l od uz dodatak KH_2PO_4 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S) ili mliva PTSK različitih hibrida.

Posmatranjem ostvarenih prinosa etanola (Slika 4.11.) može se zaključiti da se u fermentacijom melase u ispitivanim postupcima ostvaruju značajno ($p < 0,05$) niže koncentracije etanola u poređenju sa gustim sokom. Fermentacijom podloge od melase i gustog soka u postupku bez dodatka soli ili PTSK ostvaren je najniži stepen konverzije šećera od 80,08% i 86,20% i najniža koncentracija etanola od $59,85 \pm 1,28$ g/l i $64,54 \pm 1,58$ g/l. Fermentacijom podloga od melase i gustog soka uz dodatak KH_2PO_4 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M+S i GS+S) postignut je stepen konverzije šećera od 82,86 %, odnosno 92,97% i koncentracija etanola od $62,75 \pm 1,84$ g/l, odnosno $68,96 \pm 0,97$ g/l.



Slika 4.11. Koncentracija etanola nakon fermentacije melase i gustog soka početnog sadržaja šećera 150 g/l, pomoću slobodnih ćelija kvasca uz dodatak KH_2PO_4 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S) i uz dodatak mliva PTSK različitih hibrida.

Fermentacijom podloga od melase sa dodatkom 10 g/l PTSK postižu se značajno više ($p < 0,05$) koncentracije etanola nego fermentacijom podloge bez dodatka. Ostvarena koncentracija etanola je bila od $66,46 \pm 0,39$ g/l za hibrid Gold Cup do $72,59 \pm 1,18$ g/l za hibrid NS 3014, odnosno stepen konverzije šećera od $88,71 \pm 0,51\%$ za hibrid Gold Cup do $94,70 \pm 0,92\%$ za hibrid NS 3014. Povećanje koncentracije etanola dobijenog fermentacijom melase je izraženije u postupku uz dodatak hibrida NS 3014 (12,74 g/l) PTSK, a manje izraženo u postupku uz dodatak hibrida Gold Cup (6,61 g/l) PTSK, što je u saglasnosti sa količinom ekstrahovanih šećera (tabela 4.4.). Ovo navodi na pretpostavku da ćelije kvasca fermentišu šećere ekstrahovane iz PTSK.

Dodatkom 10 g/l PTSK u podlogu od gustog soka postiže se stepen konverzije šećera od $93,69 \pm 1,34\%$ za hibrid NS 7016 do $98,38 \pm 0,57\%$ za hibrid NS 6010 i koncentracija etanola

od $68,75 \pm 1,03$ g/l za hibrid NS 7016 do $73,88 \pm 0,43$ g/l za hibrid NS 6010. Povećanje vrednosti koncentracije etanola u fermentisanim podlogama na bazi gustog soka je izraženije u postupku uz dodatak PTSK hibrida NS 6010 (8,90 g/l), a manje izraženo u postupku uz dodatak PTSK hibrida 7016 (14,03 g/l).

Dodatkom PTSK u podloge za fermentaciju ostvareno je veće povećanje koncentracije etanola za gusti sok nego za melasu. Pored toga, povećanje koncentracije etanola iz gustog soka za razliku od melase nije bilo u korelaciji sa količinom ekstrahovanih šećera. Na osnovu analize sadržaja pepela (Tabela 4.12.) je utvrđeno da je gusti sok značajno siromašniji mineralnim materijama od melase, pa se pretpostavlja da je ekstrakcija mineralnih materija bila više izražena usled većeg gradijenta koncentracije. U gustom soku je prisustvo esencijalnih materija za kvasac, ekstrahovanih iz PTSK, imalo više uticaja na koncentraciju etanola nego prisustvo ekstrahovanih šećera. Takođe se može pretpostaviti da nakon ekstrakcije ili rastvaranja komponenti iz PTSK različitih hibrida u određenoj meri dolazi do reakcije istih sa komponentama iz podloge, pa novonastali produkti mogu manje ili više pogodovati metabolizmu ćelija kvasca. Različiti autori su potvrdili da dodatak određenih hranljivih materija kao što su ekstrakt kvasca (Casey i sar., 1984; Bafrcová i sar., 1999), azot (Jones i sar., 1994), amino azot (Thomas i Ingledew, 1990), urea (Jones i Ingledew, 1994), kalcijum i magnezijum (Dombek i sar., 1986) imaju zaštitni efekat na ćelije kvasca i stimulišu rast ćelija pa samim tim pozitivno utiču na povećanje produktivnosti etanola. Interesantno je napomenuti da se dodatkom PTSK svih ispitivanih hibrida u potpuno suzbija penivost podloga od melase i gustog soka tokom fermentacije i destilacije, pa se ovaj materijal može koristiti kao antipenušavac.

Dodatkom 10 g/l ispitovanih PTSK hibrida u podloge za fermentaciju od melase i gustog soka skraćuje se vreme fermentacije za 10 h, postiže se viši stepen konverzije šećera i viša koncentracije etanola. Dodatak PTSK primenjenih hibrida u podlogu za fermentaciju ima isti ili povoljniji uticaj na prinos i produktivnost etanola nego dodatak komercijalnih soli.

Prikazani rezultati potvrđuju da PTSK ispitivanih hibrida može poslužiti kao suplement i predstavlja adekvatnu zamenu odnosno alternativni obnovljivi izvor mineralnih materija i šećera neophodnih kvascu tokom fermentacije melase i gustog soka. Pored toga, prisustvo PTSK pozitivno utiče na suzbijanje nastale pene tokom fermentacije i destilacije pa se može koristiti kao antipenušavac.

4.2.4. Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe primenom imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska

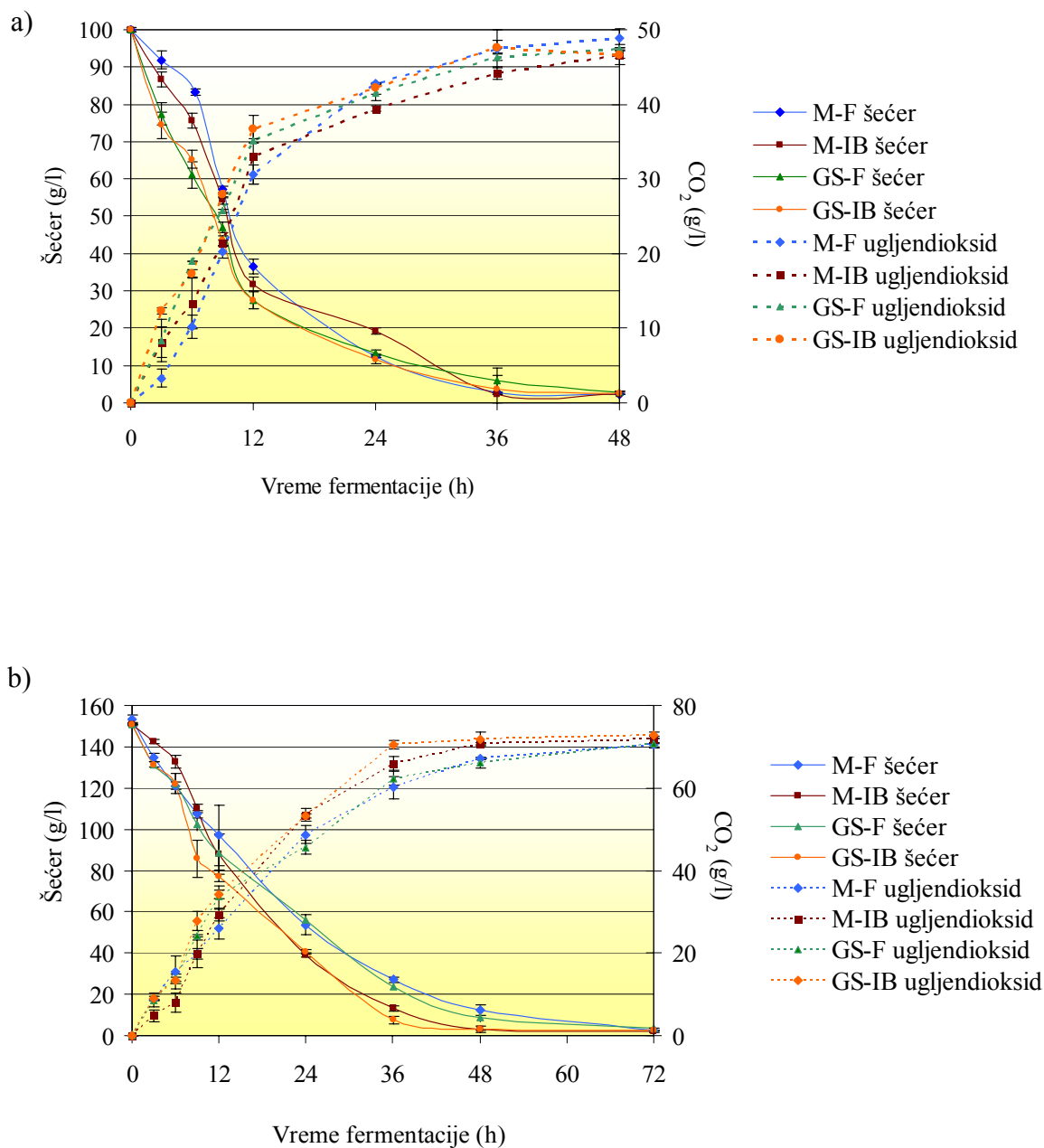
Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe sa početnim sadržajem šećera 100 g/l, 150 g/l i 300 g/l (VHG) je izvedena kako bi se ispitaio uticaj prirode sirovine i početne koncentracije šećera na parametre i tok fermentacije. Kao proizvodni mikroorganizam u eksperimentima je korišćen *S. cerevisiae* (DTN). Fermentacije su izvedene primenom kako slobodnih ćelija (F, engl. free) tako i imobilisanih ćelija (IB, engl. immobilized biocatalyst) na PTSK obliku diska prečnika 1,5-2 cm i visine 0,5 cm. Kako bi se izbegao uticaj ekstrahovanih komponenti iz PTSK na parametre fermentacije, imobilizacija ćelija je prvo izvedena u sintetskom medijumu, a zatim su diskovi PTSK sa imobilisanim ćelijama izdvojeni iz sintetskog medijuma i preneti u istu zapreminu podloge za fermentaciju. Početna količina suve mase kvasca u podlozi nakon inokulacije je iznosila $1,09 \pm 0,05$ g/l.

Na slici 4.12. je prikazano usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom fermentacije podloga od melase i gustog soka sa početnom koncentracijom šećera a) 100 g/l, b) 150 g/l.

Tokom fermentacije podloga početne koncentracije šećera 100 g/l najveći deo prisutnih šećera je usvojen tokom prvih 24 h, pa je fermentacija u ovom periodu bila značajno brža nego u periodu posle 24 h. U fermentacionom sistemu sa slobodnim ćelijama nakon 48 h usvojeno je 97,7% i 97,1% raspoloživog šećera iz melase i gustog soka. U fermentacionom sistemu sa imobilisanim ćelijama nakon istog vremenskog perioda usvojeno je 97,7% i 97,5% šećera iz melase i gustog soka.

U sistemu sa slobodnim ćelijama, fermentacija melase i gustog soka početne koncentracije šećera 150 g/l je trajala 72 h i usvojeno je 98,2% i 97,5% šećera. U fermentacionom sistemu sa imobilisanim ćelijama najveći deo šećera je usvojen tokom prvih 48 h fermentacije, dok je nakon 72 h postignut stepen konverzije šećera melase i gustog soka od 98,5% i 98,3%.

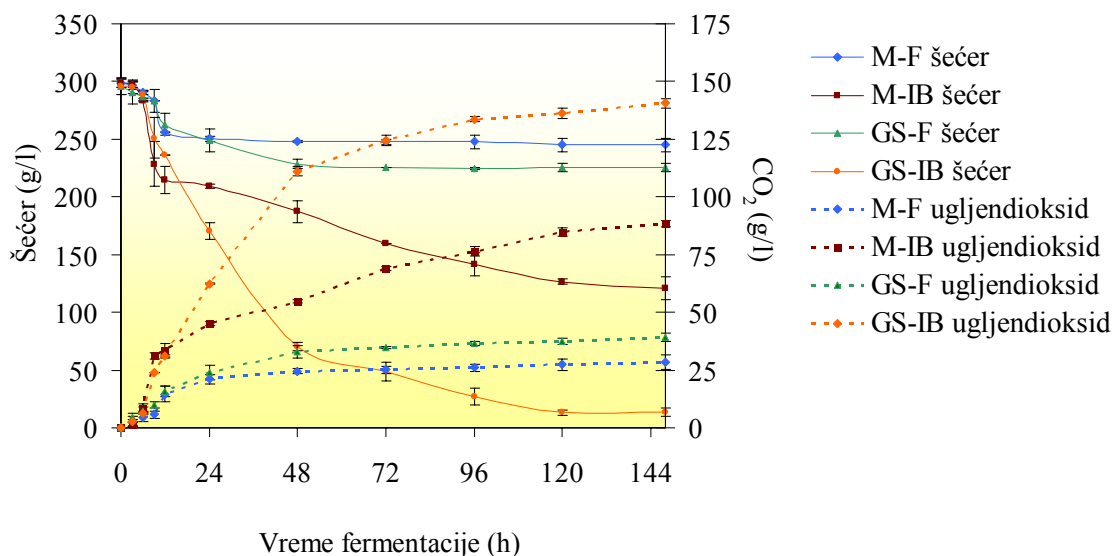
Posmatranjem toka usvajanja šećera i izdvajanja CO₂ tokom fermentacije pod standardnim uslovima koncentracije šećera (100 g/l i 150 g/l) uočena je uobičajena dinamika usvajanja šećera iz melase i gustog soka bez značajnih razlika u trajanju fermentacije primenom slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca. Ovo navodi na zaključak da je primenom ćelija imobilisanih na PTSK ostvaren dobar kontakt između hranljive podloge i ćelija, kao i efikasna difuzija produkata kroz strukturu PTSK sa minimalnim ograničenjima internog prenosa mase, što je posledica visokog stepena poroznosti ovog nosača. Pored toga, u ovim eksperimentalnim uslovima nije utvrđena statistički značajna razlika u trajanju fermentacije melase i gustog soka.



Slika 4.12. Usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom fermentacije melase (M) i gustog soka (GS početne koncentracije šećera a) 100 g/l i b) 150 g/l primenom slobodnih ćelija (F) i imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska (IB).

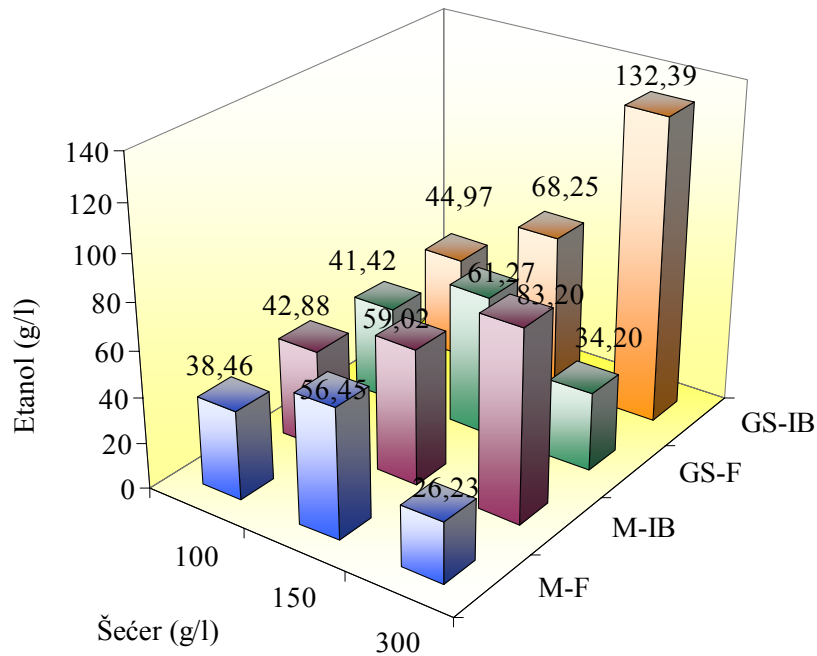
Nasuprot ovome, pri uslovima veoma visoke koncentracije šećera VHG (300 g/l), koncentracija šećera u melasi i gustom soku je u velikoj meri uticala na dinamiku usvajanja

šećera i izdvajanja CO₂ pa samim tim i na trajanje fermentacije (Slika 4.13.). Tokom prvih 9h, VHG fermentacije, nije došlo do značajnog usvajanja šećera kako u sistemu sa slobodnim, tako i u sistemu sa imobilisanim ćelijama, usled adaptacije kvasca na uslove visokog osmotskog pritiska u podlozi. Pri koncentraciji šećera u podlozi 300 g/l osmotski pritisak iznosi 22 atm (Reddy i Reddy, 2006). Ovo može biti posledica osmotskog stresa ćelija kvasca izazvanog visokom koncentracijom šećera u podlozi, čime je ugrožen metabolizam i rast ćelija kvasca. Pri VHG uslovima primenom slobodnih ćelija kvasca fermentacija je završena nakon 48 h, pri čemu je usvojeno samo 18,4% i 24,8% šećera iz melase i gustog soka, pa se može zaključiti da je usled uticaja osmotskog stresa ugrožena sposobnost ćelija kvasca da usvajaju šećere iz podloge. Nasuprot tome primenom imobilisanih ćelija kvasca nakon 120 h fermentacije usvojeno je 59,7% i 95,5% šećera iz melase i gustog soka. U sistemu sa imobilisanim ćelijama, nakon faze adaptacije, tokom VHG fermentacije melase, koncentracija šećera je postepeno opadala do 120 h. Tokom 48h VHG fermentacije gustog soka koncentracija šećera je naglo opala, a zatim postepeno do kraja fermentacije. Na kraju VHG fermentacije melase i gustog soka primenom slobodnih ćelija kvasca, koncentracija šećera je iznosila 244,92±4,12 g/l i 225,68±9,62, a primenom imobilisanih ćelija su ostvarene značajno niže ($p < 0,05$) vrednosti od 122±6,79 g/l i 13,38±3,35 g/l. Količina izdvojenog CO₂ tokom ispitivanih fermentacija je bila u saglasnosti sa količinom usvojenog šećera.



Slika 4.13. Usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom VHG fermentacije melase (M) i gustog soka (GS), početne koncentracije šećera 300 g/l, primenom slobodnih ćelija (F) i imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska (IB).

Na kraju fermentacije melase i gustog soka početne koncentracije šećera (100 g/l, 150 g/l i 300 g/l) primenom imobilisanih ćelija kvasca ostvarena je viša ($p < 0,05$) koncentracija etanola u poređenju sa slobodnim ćelijama (Slika 4.14.).



Slika 4.14. Koncentracija etanola nakon fermentacije melase (M) i gustog soka (GS) primenom slobodnih ćelija (F) i imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska (IB).

Na osnovu rezultata na slici 4.14. se može zapaziti da je primenom imobilisanih ćelija kvasca u fermentaciji melase ostvareno povećanje koncentracije etanola od 4,42 g/l, 2,56 g/l i 56,97 g/l pri početnoj koncentraciji šećera od 100 g/l, 150 g/l i 300 g/l. Fermentacijom gustog soka, pomoću imobilisanih ćelija kvasca ostvareno je povećanje koncentracije etanola od 3,56 g/l, 6,98 g/l i 98,19 g/l za početne koncentracije šećera od 100 g/l, 150 g/l i 300 g/l.

Nakon VHG fermentacije melase i gustog soka u sistemu sa slobodnim ćelijama kvasca ostvarena je koncentracija etanola od $26,23 \pm 0,83$ g/l i $34,20 \pm 1,70$ g/l, dok su primenom imobilisanih ćelija kvasca ostvarene značajno više vrednosti od $83,20 \pm 0,99$ g/l i $132,39 \pm 1,81$ g/l. Vrednosti koncentracije etanola ostvarenih pod VHG uslovima fermentacije u sistemu sa imobilisanim ćelijama su tri puta više od vrednosti ostvarenih u sistemu sa slobodnim ćelijama. Ovo povećanje koncentracije etanola u sistemu sa imobilisanim ćelijama može biti posledica velike gustine imobilisanih ćelija kvasca u PTSK. Slični rezultati postignuti su primenom ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na kori pomorandže (Plessas i sar. 2007).

Parametri fermentacije ostvareni na kraju diskontinualne fermentacije melase i gustog soka primenom slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska su prikazani u tabeli 4.17.

Tabela 4.17. Parametri diskontinualne fermentacije melase i gustog soka primenom slobodnih (F) i imobilisanih ćelija kvasca na PTSK u obliku diska (IB).

Sirovina	Kvasac	Početni šećer S_o (g/l)	Stepen konverzije šećera Y_s (%)	Koncentracija etanola P (g/l)	Produktivnost etanola Q_p (g/lh)	Prinos etanola na usvojeni šećer $Y_{p/s}$ (g/g)	Efikasnost fermentacije $E_{p/s}$ (%)
Melasa	F	100	97,7	38,46 ± 1,14	0,84 ± 0,02	0,411 ± 0,013	80,6
	F	150	98,2	56,45 ± 0,04	0,83 ± 0,00	0,403 ± 0,000	79,1
	F	300	18,4	26,23 ± 0,83	0,56 ± 0,02	0,492 ± 0,021	96,5
	IB	100	97,7	42,88 ± 0,28	0,94 ± 0,02	0,446 ± 0,003	87,5
	IB	150	98,5	59,02 ± 0,00	1,26 ± 0,00	0,408 ± 0,000	80,1
	IB	300	59,6	83,20 ± 0,99	0,74 ± 0,01	0,494 ± 0,013	96,8
Gusti sok	F	100	97,1	41,42 ± 0,55	0,86 ± 0,01	0,427 ± 0,005	83,7
	F	150	97,5	61,27 ± 0,91	0,85 ± 0,01	0,419 ± 0,007	82,2
	F	300	24,8	34,20 ± 1,70	0,71 ± 0,04	0,465 ± 0,037	91,2
	IB	100	97,5	44,97 ± 0,79	0,94 ± 0,02	0,461 ± 0,004	90,5
	IB	150	98,3	68,25 ± 0,55	1,42 ± 0,01	0,463 ± 0,001	90,8
	IB	300	95,5	132,39 ± 1,81	1,10 ± 0,02	0,462 ± 0,001	90,6

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.16., može se zaključiti da je produktivnost etanola u sistemu sa imobilisanim ćelijama značajno viša u poređenju sa slobodnim ćelijama, za sve početne koncentracije šećera, a naročito u VHG uslovima fermentacije melase i gustog soka.

U VHG uslovima, u sistemu sa slobodnim ćelijama, postignuta je produktivnost etanola od 0,563 g/l h i 0,713 g/l h za melasu i gusti sok, dok je u sistemu sa imobilisanim ćelijama produktivnost iznosila 0,736 g/l h i 1,103 g/l h. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da ćelije imobilisane na disku PTSK imaju veću produktivnost etanola u VHG uslovima od slobodnih ćelija. U sistemu sa slobodnim ćelijama je ostvaren prinos etanola iz melase i gustog soka od 0,492 g/g i 0,465 g/g, što čini 96,51% i 91,18% teorijskog prinosa. Pri VHG uslovima u sistemu sa imobilisanim ćelijama je postignut prinos etanola od 0,494 g/g i 0,462 g/g, što odgovara 96,8% i 90,6% teorijskog prinosa za melasu i gusti sok. Slični rezultati su dobijeni primenom ćelija kvasca imobilisanih na šećernoj trsci za fermentaciju soka šećerne trske i melase šećerne trske pri čemu je ostvareno povećanje koncentracije etanola (10–15% v/v), prinosa etanola, brzine i efikasnosti fermentacije kao i poboljšanje kvaliteta destilata (Liang i sar., 2008). Yu i sar. (2007) su koristili ćelije *S. cerevisiae* imobilisane na ostacima prerade sirka tzv. bagazi sirka, koja je takođe lignocelulozni materijal, za fermentaciju glukozno-saharoznog sintetskog medijuma. Ovi autori su potvrdili da ćelije kvasca imobilisane na bagazi sirka imaju 2,24 puta višu produktivnost etanola u poređenju sa slobodnim ćelijama kvasca.

Povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi dolazi do opadanja sposobnosti usvajanja šećera ćelija kvasca, što ima za posledicu smanjenje stepena konverzije šećera pa samim tim i opadanje produktivnosti etanola. Ovo može biti posledica osmotskog stresa kvasca izazvanog visokom koncentracijom šećera, kao i posledica inhibiornog dejstva proizvoda fermentacije kao što su etanol, glicerol, sirćetna kiselina i CO₂ (Reddy i sar., 2006). Prikazani rezultati u tabeli 4.17. potvrđuju da ćelije kvasca imobilisane na disku PTSK predstavljaju efikasan biokatalizator za alkoholnu fermentaciju melase i gustog soka šećerne repe u širokim granicama početne koncentracije šećera.

Uzimajući u obzir ostvarene parametre fermentacije kao i potrošnju vode i energije u VHG uslovima, može se zaključiti da je gusti sok šećerne repe ekonomski isplativija sirovina za proizvodnju etanola od melase. Sa stanovišta ekonomičnosti proizvodnje veoma je važno ostvariti visoke koncentracije etanola u fermentisanoj podlozi, kako bi se smanjili troškovi u procesu destilacije, koji čine 35-40% ukupnih troškova konverzije šećera u etanol. Pored toga moguće je koristiti fermentore manjih dimenzija (Nigam, 2000). Primena VHG tehnologije u industriji podrazumeva uštedu procesne vode i energije, manje kapitalne troškove, kao i smanjen rizik od bakterijske kontaminacije (Laopaiboon i sar., 2009; Wang i sar., 2007; Bai i sar., 2009). Bolja produktivnost etanola u sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca u odnosu na sisteme sa slobodnim ćelijama, naročito u VHG uslovima, može se pripisati činjenici da imobilisane ćelije kvasca imaju značajno viši sadržaj zasićenih masnih kiselina u poređenju sa slobodnim ćelijama, pa samim tim imaju i veću otpornost na osmotski stres i toksični efekat etanola (Yu i sar., 2007).

Visoka fermentativna aktivnost imobilisanih ćelija kvasca u VHG uslovima može se objasniti velikom gustom biomase kvasca u nosaču i/ili osmotskim zaštitnim dejstvom ćelija kvasca imobilisanih na spoljnoj površini nosača u odnosu na ćelije imobilisane u dubini nosača, slično kao što je slučaj sa imobilizacijom ćelija kvasca u biokapsulama (Peinado i sar., 2006). Prema navodima Rychtera i sar. (1987) imobilisane ćelije kvasca značajno duže zadržavaju visoku enzimsku aktivnost od slobodnih ćelija usled različitog sadržaja proteina, lipida, RNA, DNA i neorganskih supstanci u ćelijama. Pored toga, kako je utvrđeno elektronskom mikroskopijom, jedan deo ćelija je imobilisan ispod površine PTSK i integrisan u strukturu ovog materijala, pa se može pretpostaviti da u ovom slučaju sam nosač predstavlja mehaničku barijeru između ćelija i supstrata i na taj način pruža zaštitu ćelijama od stresnih uticaja sredine, kao što je visok sadržaj šećera u podlozi. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa istraživanjima drugih autora koja potvrđuju da material nosača za imobilizaciju može služiti kao zaštita ćelijama kvasca od toksina i inhibitora (Phisalaphong i sar., 2007).

Rezultati fermentacije su u korelaciji sa rezultatima vrednosti pH i sadržaja rastvorljivih soli (TDS) fermentisanih podloga od melase i gustog soka tokom fermentacije (tabela 4.18.).

Tabela 4.18. Vrednost pH, provodljivost i sadržaj rastvorljivih soli (TDS) podloga na početku i kraju fermentacije primenom slobodnih (F) i imobilisanih (IB) ćelija kvasca na PTSK u obliku diska.

Sirovina	Kvasac	Početni šećer S_o (g/l)	pH	Provodljivost (mS/cm)	Ukupne rastvorljive soli TDS (g/l)
Melasa	F	100	5,5-4,9	12,6-21,7	7,95-10,89
	F	150	5,5-5,2	25,9-28,3	12,60-16,50
	F	300	5,5-5,4	27,2-29,2	15,00-16,80
	IB	100	5,5-5,0	14,9-16,6	8,36-9,33
	IB	150	5,5-5,3	21,4-24,3	10,86-13,90
	IB	300	5,5-5,4	27,3-31,2	15,80-18,40
Gusti sok	F	100	5,5-3,8	2,67-3,54	1,43-1,90
	F	150	5,5-4,0	3,12-4,21	1,68-2,20
	F	300	5,5-4,7	3,74-5,47	2,01-2,96
	IB	100	5,5-4,1	2,37-3,08	1,27-1,65
	IB	150	5,5-4,5	3,00-4,09	1,52-2,20
	IB	300	5,5-4,7	3,38-4,35	1,90-2,30

Analizirajući podatke iz tabele 4.18. može se zapaziti da je vrednost pH fermentisanih podloga od gustog soka opala tokom fermentacije u većoj meri nego pH podloga od melase. Opadanje vrednosti pH tokom fermentacije u svim ispitivanim sistemima je bilo u saglasnosti sa dinamikom usvajanja šećera. U svim eksperimentima najveći pad vrednosti pH je uočen na početku fermentacije, dok je pri kraju fermentacije vrednost pH sporije opadala da bi na kraju došlo do stagnacije. Prema navodima Malbaše i sar. (2008) ovaj fenomen se može povezati sa pufernim dejstvom, do kojeg dolazi usled reakcija između sintetisanih organskih kiselina i mineralnih soli u podlozi.

Električna provodljivost fermentisanih podloga je u direktnoj vezi sa koncentracijom rastvorenih jonizovanih soli. Merenjem električne provodljivosti na laboratorijskim instrumentima dobija se približna vrednost koncentracije ukupnih rastvorljivih soli (TDS), uglavnom sa greškom od 10%. TDS je ukupan sadržaj mobilnih naelektrisanih jona, uključujući mineralne soli i metalne jone rastvorene u jedinici mase vode. Najčešći hemijski konstituenti TDS-a koji se mogu naći u fermentisanim podlogama su katjoni kalcijuma, magnezijuma, natrijuma i olova, kao i anjoni karbonata, bikarbonata, hlorida, sulfata i nitrata (Basha i sar., 2008). Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.18., se može konstatovati da je sadržaj ukupnih rastvorljivih soli u podlogama od melase oko šest puta viši nego u podlogama od gustog soka. Međutim, povećanjem koncentracije šećera u podlogama, povećava se i sadržaj rastvorljivih soli od kojih najveći deo čine neorganske

soli. Visok sadržaj neorganskih soli u VHG podlogama na bazi melase može da dovede do dodatnog povećanja osmotskog pritiska, što dalje dovodi do inhibicije ćelijskog rasta i proizvodnje etanola (Ergun i Mutlu, 2000). Tokom fermentacije je došlo do postepenog linearnog porasta koncentracije TDS-a u svim fermentacionim sistemima, kao posledica metaboličke aktivnosti kvasca i/ili ekskrecije sadržaja ćelija kvasca. Posmatranjem vrednosti provodljivosti i koncentracije TDS-a, na kraju fermentacije, mogu se uočiti više vrednosti u sistemima sa imobilisanim ćelijama u poređenju sa sistemima sa slobodnim ćelijama kako za podloge od melase, tako i za podloge od gustog soka. Viši sadržaj ukupnih rastvorljivih soli u fermentisanim podlogama iz sistema sa imobilisanim ćelijama može biti posledica ekstrakcije komponenti PTSK novonastalim etanolom prisutnim u fermentacionoj podlozi.

Kako bi se ispitala mogućnost korišćenja imobilisanog biokatalizatora u ponovljenim diskontinualnim ili kontinualnim fermentacijama, nakon završene fermentacije je određen stepen imobilizacije (R_i , g/g), koncentracija imobilisanih ćelija (X_i , g/l), koncentracija slobodnih ćelija (X_s , g/l), koncentracija ukupnih (slobodnih i imobilisanih) ćelija (X_t , g/l) i efikasnost imobilizacije (Y_i , %) na kraju fermentacije melase i gustog soka (tabela 4.19.). Ovi rezultati su upoređeni sa početnim parametrima imobilizacije.

Stepen imobilizacije ćelija kvasca (R_i) pre inokulacije podloga je iznosio $0,125 \pm 0,005$ g/g. Nakon fermentacije melase i gustog soka ostvarene su više vrednosti R_i u poređenju sa početnom vrednošću. Na osnovu ovoga se može zaključiti da imobilisane ćelije na površini i u šupljinama PTSK mogu da rastu i da se umnožavaju. Pri standardnim uslovima koncentracije šećera (100 i 150 g/l) nema statistički značajne razlike između vrednosti R_i na kraju fermentacije melase i gustog soka, pa se može smatrati da u ovim uslovima supstrat nema presudnog uticaja na stepen imobilizacije. Na kraju fermentacije melase u VHG uslovima je ostvaren niži ($p < 0,05$) stepen imobilizacije (0,170 g/g) nego na kraju fermentacije gustog soka (0,232 g/g). Ovo može biti posledica uticaja hemijskog sastava podloge. Efikasnost adsorpcije kvasca na nosač za imobilizaciju u velikoj meri zavisi od varijacija u sastavu podloge za fermentaciju i koncentracije pojedinih komponenti koje imaju snažan uticaj na naelektrisanje površine nosača za imobilizaciju (Fujii i sar., 1999; Yu i sar., 2007; Santos i sar., 2008). Kako je prethodno ustanovljeno, adsorpcija negativno naelektrisanih čestica, pa time i ćelija kvasca na površinu PTSK je efikasnija pri nižim vrednostima pH. Ovo se može objasniti činjenicom da niže vrednosti pH fermentisanih podloga od gustog soka doprinose boljem elektrostatičkom vezivanju kvasca na PTSK, pa samim tim i boljoj adsorpciji, u poređenju sa melasom.

Količina suve mase kvasca u fermentacionoj podlozi nakon inokulacije iznosila je $1,09 \pm 0,05$ g/l, za sisteme sa slobodnim i imobilisanim ćelijama kvasca. Poređenjem početne i ukupne krajnje količine kvasca u svim ispitanim fermentacionim sistemima zaključuje se da tokom fermentacije u svim eksperimentima dolazi do umnožavanja ćelija kvasca.

Tabela 4.19. Parametri imobilizacije kvasca na disku PTSK u odnosu na slobodne ćelije nakon diskontinualne fermentacije melase i gustog soka.

Sirovina	Kvasac	Početni	Stepen	Koncentracija	Koncentracija	Koncentracija	Efikasnost
		šećer S_o (g/l)	imobilizacije R_i (g/g)	imobilisanih ćelija X_i (g/l)	slobodnih ćelija X_s (g/l)	ukupnih ćelija X_t (g/l)	imobilizacije Y_i (%)
Melasa	F	100	-	-	5,04 ± 0,09	5,04 ± 0,09	-
	F	150	-	-	3,00 ± 0,08	3,00 ± 0,08	-
	F	300	-	-	1,92 ± 0,05	1,92 ± 0,05	-
	IB	100	0,336 ± 0,046	2,95 ± 0,40	3,12 ± 0,05	6,07 ± 0,45	48,6
	IB	150	0,310 ± 0,083	2,72 ± 0,73	2,72 ± 0,06	5,44 ± 0,79	50,0
	IB	300	0,170 ± 0,030	1,49 ± 0,26	1,49 ± 0,03	2,98 ± 0,29	49,9
Gusti sok	F	100	-	-	5,36 ± 0,11	5,36 ± 0,11	-
	F	150	-	-	3,52 ± 0,16	3,52 ± 0,16	-
	F	300	-	-	1,44 ± 0,23	1,44 ± 0,23	-
	IB	100	0,310 ± 0,148	2,71 ± 1,30	4,79 ± 0,05	7,50 ± 1,35	36,2
	IB	150	0,240 ± 0,021	2,10 ± 0,18	4,85 ± 0,03	6,95 ± 0,21	30,3
	IB	300	0,232 ± 0,015	2,03 ± 0,13	4,93 ± 0,05	6,96 ± 0,18	29,2

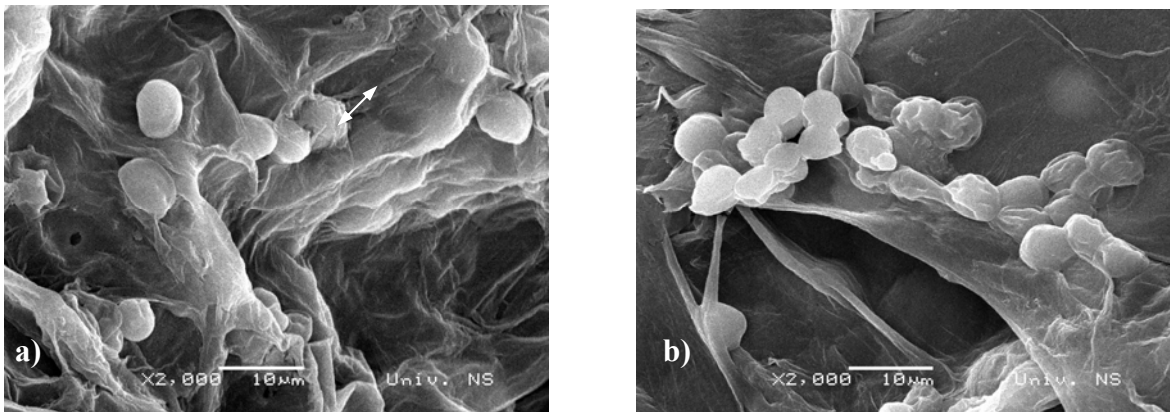
U fermentacionim sistemima sa slobodnim ćelijama, najviša koncentracija kvasca (X_s) od 5,04 g/l i 5,36 g/l je postignuta u fermentisanoj podlozi pri početnoj koncentraciji šećera od 100 g/l, za melasu i gusti sok. Povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi, količina ćelija u fermentacionim sistemima sa slobodnim ćelijama opada. Pod VHG uslovima (300 g/l) koncentracija slobodnih ćelija na kraju fermentacije melase i gustog soka (1,92 g/l i 1,44 g/l) je približno dvostruko niža u odnosu na vrednosti ostvarene pri standardnim uslovima koncentracije šećera. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da je pri VHG uslovima rast slobodnih ćelija kvasca značajno usporen i samim tim je u ovim uslovima ostvarena najniža produktivnost etanola.

Za razliku od fermentacionog sistema sa slobodnim ćelijama, u sistemu sa imobilisanim ćelijama ukupna količina kvasca na kraju fermentacije gustog soka je bila značajno viša nego na kraju fermentacije melase, naročito u VHG uslovima. Prinos biomase kvasca tokom fermentacije u velikoj meri zavisi od prirode podloge (Malbaša i sar., 2008). Razlike u prinosu biomase kvasca za gusti sok i melasu mogu biti posledica različitih vrednosti pH i koncentracije TDS-a u podlogama. Koncentracija kvasca nakon VHG fermentacije gustog soka (6,96 g/l) je dvostruko viša nego za melasu (2,98 g/l). Ove razlike se mogu pripisati izrazito višoj koncentraciji TDS-a u melasi (15,80-18,40 g/l) nego u gustom soku (1,90-2,30 g/l). Na osnovu ovih rezultata se može pretpostaviti da su ćelije kvasca u VHG uslovima fermentacije melase pored osmotskog stresa izložene i stresu usled visoke koncentracije različitih katjona i anjona. Pri tome treba imati u vidu da povećane

koncentracije nekih komponenata TDS-a mogu imati inhibitorni efekat na metaboličku aktivnost kvasca i mogu značajno usporiti ćelijski rast. Na primer, degradacioni produkti pesticida i fungicida koji se koriste kao agrotehnička mera tokom uzgoja šećerne repe u procesu proizvodnje šećera prelaze u melasu i mogu u zavisnosti od koncentracije manje ili više inhibirati rast ćelija kvasca tokom fermentacije (Razmovski i Pucarević, 2002; Razmovski i Pucarević, 2004). Visoka koncentracija fungicida ili degradacionih produkata pesticida u melasi ima genotoksični efekat na *S. cerevisiae* (Razmovski i Pejin, 1997).

Interesantno je napomenuti da je ukupna koncentracija kvasca (X_t) na kraju VHG fermentacije gustog soka u sistemu sa imobilisanim ćelijama bila gotovo ista kao pri standardnim uslovima koncentracije šećera, pa se može zaključiti da ćelijski rast nije bio značajno usporen. U fermentacionim sistemima sa imobilisanim ćelijama, količina slobodnih ćelija (X_s) je značajno viša u podlogama od gustog soka u poređenju sa melasom, usled desorpcije i ispiranja imobilisanih ćelija kvasca sa nosača. Ostvarena je niža efikasnost imobilizacije (Y_i) u fermentisanim podlogama od gustog soka (29,2-36,2%) nego od melase (48,6-50,0%). Analizirajući rezultate efikasnosti imobilizacije se može zaključiti da se na kraju fermentacije melase i gustog soka sa nosača ispere više od 50% imobilisanih ćelija kvasca usled visokog stepena poroznosti PTSK. Ovo predstavlja osnovni nedostatak adsorpcione metode imobilizacije. Pri tome treba imati u vidu da u slučaju imobilizacije ćelija kvasca adsorpcijom na površini nerastvornih nosača rast ćelija nije ugrožen i neke od njih mogu biti isprane iz sistema i kontinualno obnovljene (Bai i sar., 2008).

Elektronskom mikroskopijom je potvrđeno da su nakon VHG fermentacije melase i gustog soka ćelije kvasca vezane na površini i ispod površine PTSK (Slika 4.15.).

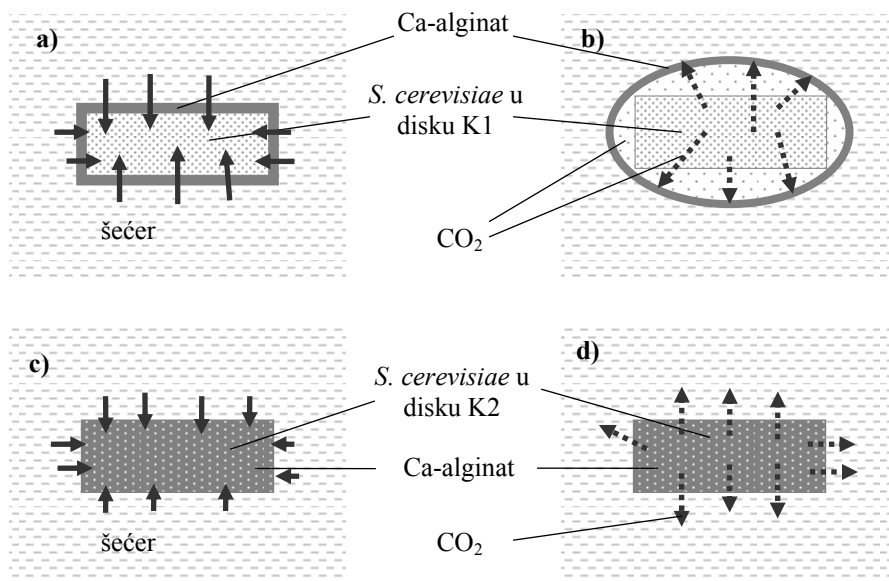


Slika 4.15. SEM snimak ćelija kvasca imobilisanih na PTSK nakon VHG fermentacije a) melase i b) gustog soka.

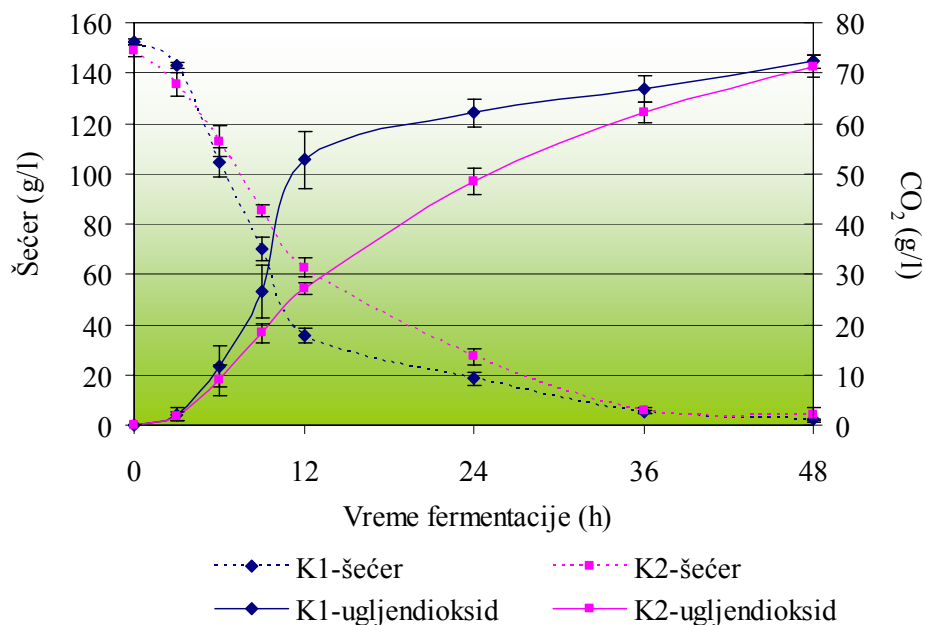
4.2.5. Fermentacija gustog soka šećerne repe primenom imobilisanih ćelija kvasca u kombinovanim diskovima od PTSK i Ca-alginata

Ekonomska isplativost fermentacionog sistema sa imobilisanim ćelijama zavisi od trajanja životnog ciklusa viabilnih ćelija, efikasnosti prenosa mase supstrata i produkata kroz nosač kao i od mogućnosti dugotrajne proizvodnje što čistijeg proizvoda. U tom smislu je neophodno da se u što većoj meri smanji desorpcija i ispiranje ćelija kvasca sa nosača, pa time i ispiranje ćelija iz fermentacionog sistema, kako bi se kvasac mogao izdvojiti bez upotrebe centrifuga (Najafpour i sar., 2004). U slučaju imobilizacije ćelija kvasca adsorpcijom na PTSK nakon fermentacije ispere više od polovine ćelija kvasca sa nosača (Tabela 4.19.). Ispiranje ćelija sa nosača predstavlja osnovni nedostatak prirodne imobilizacije (adsorpcijom i kapilarnim silama) ćelija kvasca (Kourkoutas i sar, 2004). Kako bi se sprečilo intenzivno ispiranje imobilisanih ćelija kvasca sa PTSK, povećao stepen imobilizacije i stabilnost imobilisanog biokatalizatora primenjena su dva različita postupka imobilizacije *S. cerevisiae* (DTN) kombinovanjem prirodne imobilizacije (adsorpcija i vezivanje ćelija kapilarnim silama) na diskovima PTSK i umrežavanja u matrici Ca-alginata. Ovi postupci kombinovane imobilizacije su šematski prikazani na slici 3.3. Imobilisane ćelije kvasca na kombinovanim nosačima u obliku diska PTSK koji je obložen slojem Ca-alginata (K1) i u obliku diska PTSK koji je ispunjen Ca-alginatom (K2) su primenjene za fermentaciju gustog soka početne koncentracije 150 g/l. Primenom ovih tehnika imobilizacije dobijena su dva nova nosača za imobilizaciju, što predstavlja novinu u ovom radu.

U prvom postupku imobilizacije kvasca na kombinovanom nosaču K1 u obliku diska PTSK obloženog slojem Ca-alginata (Slika 3.3. a) suspenzija CaCl_2 sa ćelijama kvasca prvo difunduje u pore PTSK, a nakon toga se ćelije imobilizuju adsorpcijom na površinu nosača i vezuju kapilarnim silama u porama diska. Prenosom diskova PTSK, natopljenih suspenzijom kvasca u CaCl_2 , u rastvor Na-alginata, na površini diska dolazi do reakcije CaCl_2 i Na-alginata usled čega se formira tanak sloj Ca-alginata (debljine 1-2 mm). Rastvor Na-alginata usled velikih dimenzija molekula i velikog viskoziteta ne difunduje kroz novonastali sloj Ca-alginata. Na ovaj način je sprečeno ispiranje imobilisanih ćelija kvasca sa nosača (Slika 4.16. a). Međutim, tokom fermentacije rastvor šećera lako difunduje kroz tanak sloj Ca-alginata, ćelije fermentišu šećer i nastaje CO_2 . Usled pritiska CO_2 dolazi do postepenog odvajanja tankog sloja formiranog Ca-alginata od površine PTSK, tako da se oko diska PTSK formiraju mehuri ispunjeni CO_2 (Slika 4.16. b). Usled nastanka mehura CO_2 nosači plutaju na površini podloge pa se tada ostvaruje nešto lošiji kontakt podloge sa imobilisanim ćelijama kvasca. Nakon izvesnog vremena, zbog pucanja određenog broja mehura dolazi do naglog oslobađanja CO_2 iz fermentacionog sistema naročito u periodu od šestog do dvanaestog sata fermentacije (Slika 4.17.). Na taj način dolazi do potpunog oštećenja i odvajanja opne Ca-alginata od diska PTSK. Podloga slobodno difunduje u unutrašnjost pora PTSK. Ovo dovodi do ispiranja ćelija kvasca imobilisanih kapilarnim silama u nosaču, dok adsorbovane ćelije ostaju imobilisane na površini PTSK. Nakon pucanja opne od Ca-alginata ostvaruje se dobar kontakt podloge, kako sa adsorbovanim tako i sa ispiranim ćelijama kvasca sa nosača K1. Tada je usvajanje šećera iz podloge (Slika 4.17.), pa samim tim i alkoholna fermentacija značajno brža u poređenju sa nosačem u obliku PTSK diska koji je ispunjen Ca-alginatom (K2).



Slika 4.16. Difuzija šećera i CO₂ na početku i tokom fermentacije kroz strukturu (poprečni presek) diska PTSK koji je obložen slojem Ca-alginata, K1 (a i b) i diska PTSK koji je ispunjen Ca-alginatom, K2 (c i d) sa imobilisanim ćelijama kvasca.



Slika 4.17. Usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 150 g/l primenom ćelija kvasca imobilisanih na disku PTSK koji je obložen slojem Ca-alginata (K1) i na disku PTSK koji je ispunjen Ca-alginatom (K2).

U drugom postupku kombinovane imobilizacije kvasca (Slika 3.3. b) je prvo suspenzija kvasca u Na-alginatu ispunila poroznu strukturu diskova PTSK, a zatim je nakon prenošenja diskova PTSK u rastvor CaCl_2 došlo do formiranja polimera Ca-alginata u čitavoj zapremini diska. Naime, CaCl_2 je difundovao kroz sloj novonastalog Ca-alginata. Ovim postupkom je kvasac imobilisan u disku PTSK koji je punjen Ca-alginatom i kvascem (K2) u gotovo čitavoj zapremini (Slika 4.16. c i d). Postepeno usvajanje šećera (Slika 4.17.) pa samim tim i duža fermentacija primenom kvasca imobilisanog na nosaču K2 u odnosu na nosač K1 je posledica postepene i relativno sporije difuzije supstrata i produkata kroz nosač K2.

Posmatrajući ostvarene parametre fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 150 g/l (tabela 4.20.), može se uočiti da se primenom kvasca imobilisanog na nosačima K1 i K2 ostvaruju veoma slični rezultati fermentacije. U postupcima fermentacije primenom imobilisanog kvasca na nosačima K1 i K2 je usvojeno oko 98,6% i 97,2% šećera, koncentracija etanola u fermentisanoj podlozi je iznosila oko 70,50 g/l i 70,38 g/l, produktivnost etanola je bila oko 1,469 g/lh i 1,466 g/lh, prinos etanola na usvojeni šećer je iznosio oko 0,477 g/g i 0,483 g/g, što odgovara efikasnosti fermentacije od oko 93,3% i 94,5% od teorijskog prinosa.

Tabela 4.20. Parametri fermentacije gustog soka, početne koncentracije šećera 150 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih na nosačima u obliku diskova PTSK koji su obloženi Ca-alginatom (K1) i ispunjeni Ca-alginatom (K2).

Nosač	Stepen konverzije šećera Y_s (%)	Koncentracija etanola P (g/l)	Produktivnost etanola Q_p (g/lh)	Prinos etanola na usvojeni šećer $Y_{p/s}$ (g/g)	Efikasnost fermentacije $E_{p/s}$ (%)
K1	98,6	70,50 ± 0,167	1,469 ± 0,003	0,477 ± 0,003	93,3
K2	97,2	70,38 ± 0,781	1,466 ± 0,016	0,483 ± 0,015	94,5

Parametri imobilizacije ostvareni na kraju fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 150 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih na nosačima K1 i K2, prikazani su u tabeli 4.21.

Nepostredno nakon imobilizacije početne vrednosti stepena imobilizacije (R_i) na nosačima K1 (0,310 g/g) i K2 (0,303 g/g) su bile veoma bliske ($p > 0,05$), pa se može smatrati da su obe tehnike imobilizacije podjednako uspešne. Nakon inokulacije količina suve mase kvasca u podlozi je iznosila oko 3 g/l.

Poređenjem početne i krajnje vrednosti R_i na nosaču K1 (0,296 g/g) može se zaključiti da nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$), te da je količina imobilisanih ćelija kvasca u sistemu sa nosačem K1 na kraju fermentacije ostala gotovo jednaka kao na početku. U sistemu sa nosačem K1 koncentracija imobilisanih ćelija (2,96 g/l) je značajno niža

($p < 0,05$) u poređenju sa koncentracijom slobodnih ćelija (3,26 g/l), pa je samim tim ostvarena efikasnost imobilizacije od oko 48,9%, što potvrđuje pretpostavku da je tokom fermentacije došlo kako do umnožavanja tako i do intenzivnog ispiranja imobilisanih ćelija kvasca sa ovog nosača. Usled mehaničke degradacije sloja Ca-alginata i intenzivnog ispiranja ćelija kvasca sa nosača K1 može se reći da postupak pripreme kombinovanog nosača K1 nije ispunio očekivanja u cilju povećanja stepena imobilizacije PTSK.

Tabela 4.21. Parametri kombinovane imobilizacije kvasca na diskovima PTSK obloženim Ca-alginatom (K1) i ispunjenim Ca-alginatom (K2) nakon fermentacije gustog soka, početne koncentracije šećera 150 g/l.

Nosač	Stepen imobilizacije R_i (g/g)	Koncentracija imobilisanih ćelija X_i (g/l)	Koncentracija slobodnih ćelija X_s (g/l)	Ukupna koncentracija šećera X_t (g/l)	Efikasnost fermentacije Y_i (%)
K1	0,296 ± 0,036	2,96 ± 0,37	3,26 ± 0,16	6,22 ± 0,53	48,9
K2	0,335 ± 0,013	3,35 ± 0,13	1,52 ± 0,67	4,87 ± 0,54	71,7

Nasuprot tome, tokom fermentacije primenom imobilisanog biokatalizatora na nosaču K2 dolazi do povećanja krajnje vrednosti R_i (0,335 g/g) u odnosu na početnu (0,303 g/g), što je posledica umnožavanja imobilisanih ćelija kvasca koje u ovom slučaju ostaju zadržane u strukturi nosača. Za razliku od prethodnog nosača, u sistemu sa nosačem K2 koncentracija imobilisanih ćelija (3,35 g/l) je značajno viša ($p < 0,05$) od koncentracije slobodnih ćelija (1,52 g/l), čime se ostvaruje efikasnost imobilizacije od oko 71,7% pa se može smatrati da primenom ove metode imobilizacije ćelije kvasca u većoj meri ostaju vezane za nosač.

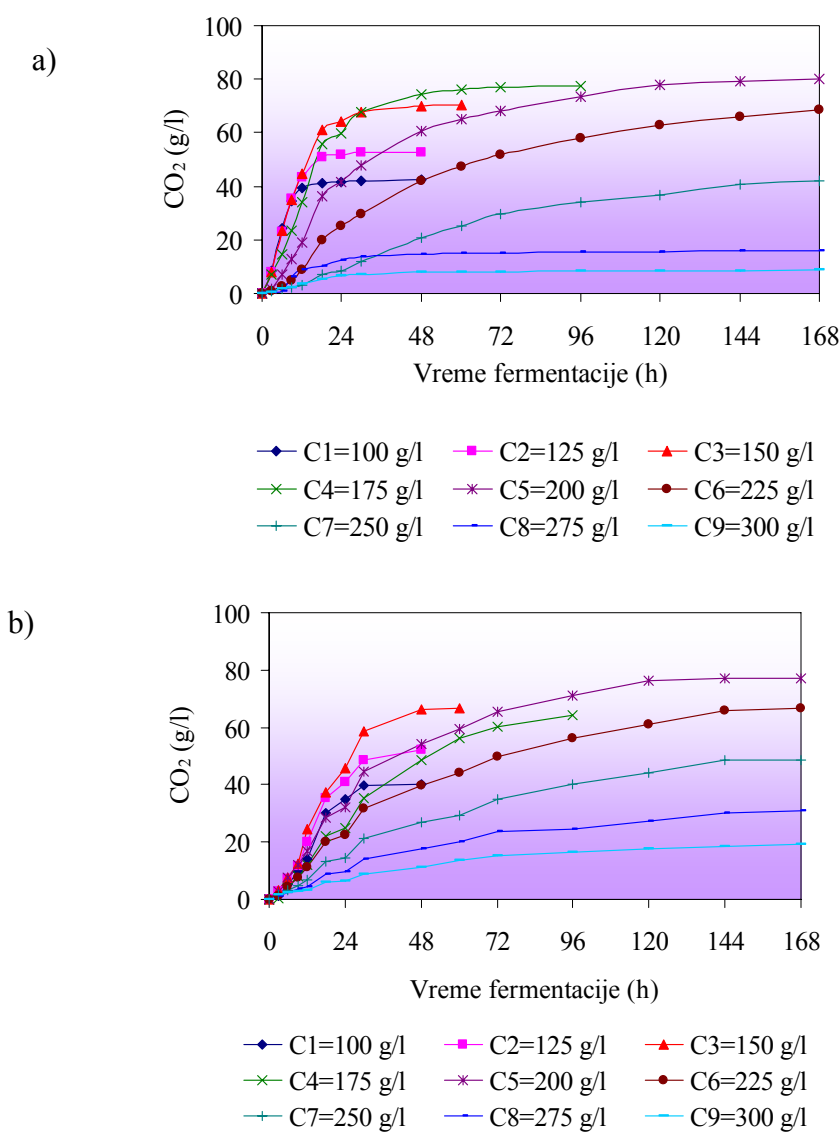
Poređenjem ukupne koncentracije kvasca, na kraju fermentacije, u sistemu sa nosačem K1 (6,22 g/l) i nosačem K2 (4,87 g/l) može se zaključiti da je primenom nosača K1 omogućeno bolje umnožavanje ćelija kvasca nego primenom nosača K2. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da se ćelije imobilisane na samoj površini umnožavaju dok je unutar relativno kompaktne strukture Ca-alginata umnožavanje imobilisanih ćelija otežano. Poznato je da prilikom umrežavanja ćelija kvasca u Ca-alginatu dolazi do ograničenog internog prenosa mase supstrata i mehaničke izolacije ćelija kvasca unutar polimera, pa ćelije locirane u središtu kuglica polimera nemaju mogućnost umnožavanja (Nedović, 1999). Kako je, međutim, primenom nosača K2 ipak došlo do umnožavanja ćelija kvasca unutar nosača može se pretpostaviti da u strukturi PTSK nije formiran potpuno kompaktan sloj Ca-alginata, te da isti nije u potpunosti ispunio svaku poru ovog materijala.

Na osnovu gore prikazanih rezultata može se zaključiti da imobilisani biokatalizator na nosaču K2 ima bolju perspektivu za primenu u višestepenim postupcima alkoholne fermentacije nego imobilisani biokatalizator na nosaču K1. Imobilizacijom kvasca na disku PTSK ispunjenom Ca-alginatom je smanjen intenzitet ispiranja ćelija kvasca sa PTSK tokom fermentacije, povećan je stepen imobilizacije kvasca kao i mehanička stabilnost i kompaktnost imobilisanog biokatalizatora.

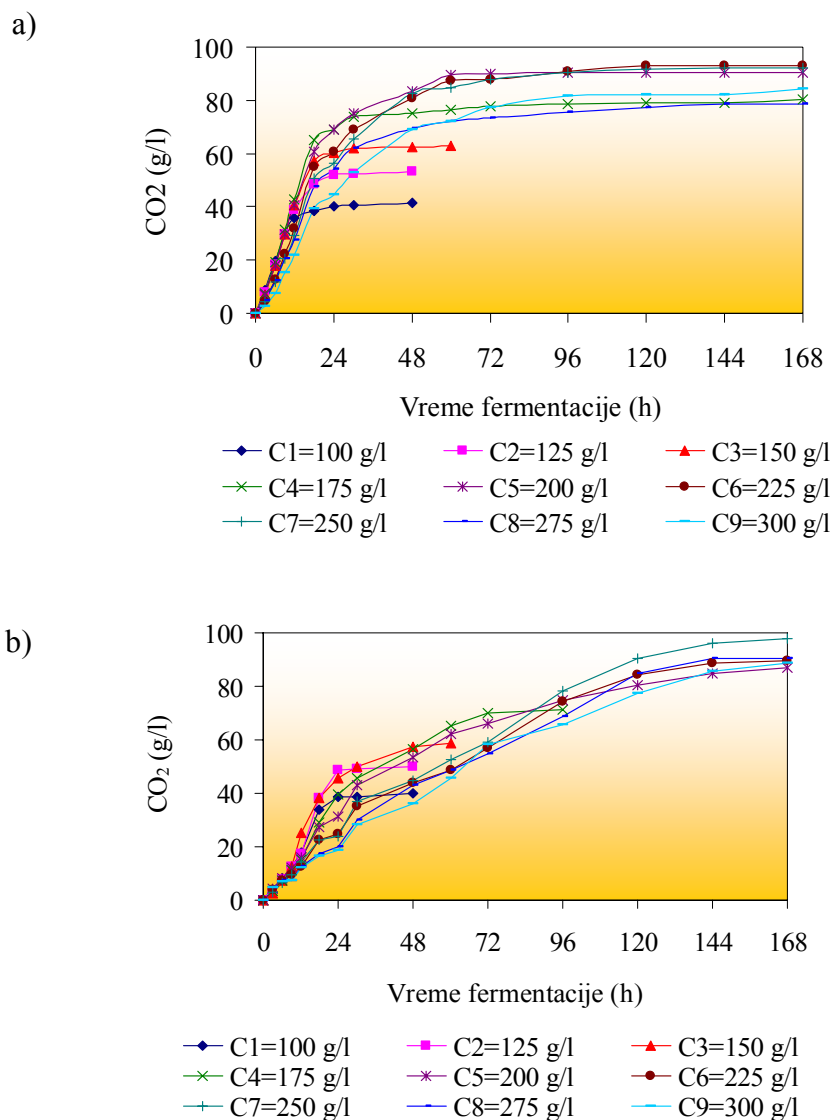
4.2.6. Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata

Fermentacija melase i gustog soka šećerne repe različitih početnih koncentracija šećera (100-300 g/l) je izvedena pomoću *S. cerevisiae* (DTN) u sistemu sa slobodnim ćelijama (F) i ćelijama imobilisanim umrežavanjem u kuglicama Ca-alginata (AB). Na ovaj način je ispitan uticaj početne koncentracije šećera i prirode sirovine na tok i finalne parametre fermentacije melase i gustog soka.

Na slikama 4.18. i 4.19. je prikazano izdvajanje CO₂ tokom fermentacije podloga od melase i gustog soka početne koncentracije šećera 100-300 g/l, pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata.



Slika 4.18. Izdvajanje CO₂ tokom fermentacije melase primenom a) slobodnih i b) ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata.



Slika 4.19. Izdvajanje CO₂ tokom fermentacije podloga od gustog soka primenom a) slobodnih i b) ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata.

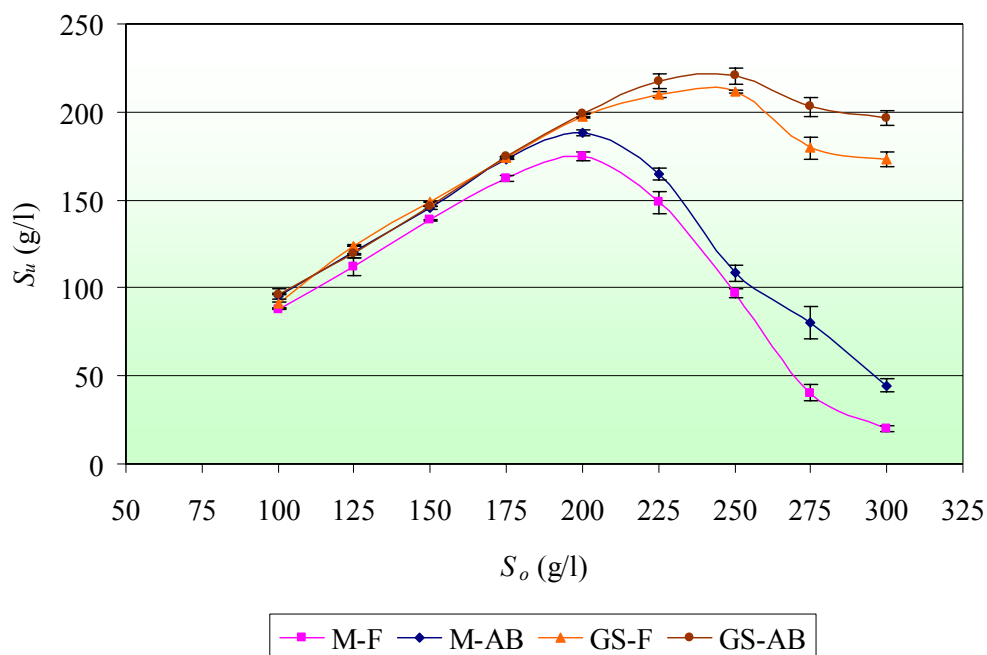
Prikazani rezultati na slikama 4.18. i 4.19. ukazuju na činjenicu da se povećanjem početnog sadržaja šećera u podlozi produžava vreme fermentacije i melase i gustog soka kako u sistemu sa slobodnim, tako i u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca. Takođe se može uočiti da je količina izdvojenog CO₂ prilikom fermentacije gustog soka nešto viša u poređenju sa melasom, kako u fermentacionom sistemu sa slobodnim ćelijama tako i u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca, posebno pri početnim koncentracijama šećera iznad 150 g/l.

U fermentacionim sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca tokom fermentacije podloga sa početnim koncentracijama šećera iznad 150 g/l se CO₂ izdvaja značajno sporije u poređenju sa sistemima sa slobodnim ćelijama, pa se može zaključiti da se CO₂ zadržava u kuglicama alginata. Pri početnim koncentracijama šećera u podlozi 100-150 g/l nije došlo do značajnijeg narušavanja strukture kuglica nosača. Međutim, tokom fermentacije podloga sa početnim koncentracijama šećera 175-300 g/l je u određenoj meri došlo do narušavanja strukture kuglica polimera. Intenzivno izdvajanje CO₂ je prouzrokovalo pojavljivanje poprečne pukotine na kuglici polimera koja je deli na dva približno jednaka dela. Stepnasti tok izdvajanja CO₂ u fermentacionim sistemima sa imobilisanim ćelijama je posebno izražen u periodu od šestog do tridesetšestog sata fermentacije i posledica je naglog pucanja kuglica gela. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da do narušavanja strukture kuglica gela dolazi u sistemima u kojima je najintenzivnije oslobađanje CO₂. Ovo navodi na zaključak da stabilnost kuglica Ca-alginata zavisi od intenziteta izdvajanja CO₂.

Čvrstina i struktura kuglica Ca-alginata zavisi od koncentracije Na-alginata upotrebljenog za njegovu pripremu, od dimenzija odnosno prečnika kuglica kao i od početne koncentracije šećera u podlozi. Povećanjem koncentracije Na-alginata povećava se gustina kuglica Ca-alginata, pa samim tim dolazi do otežanog transporta supstrata do ćelija. Primenom kuglica pripremljenih od 2% Na-alginata ostvaruje se najbolja ravnoteža između poroznosti i mehaničke čvrstine kuglica (Lee i sar., 2011). Ovi autori su za višestepenu diskontinualnu fermentaciju 10% rastvora glukoze koristili kvasac imobilisan na kuglicama Ca-alginata prečnika oko 3,8 mm koje su pripremljene od 2% Na-alginata. Nakon prve fermentacije primenom ovih kuglica nisu uočene pukotine na kuglicama. Međutim višestrukom upotrebom ovih kuglica za pet ponovljenih fermentacija dolazi do pojave pukotina i pucanja kuglica kao i do povećanja prečnika kuglica na 4,2 mm (Lee i sar., 2011).

Gilson i Thomas (1995) i Najafpour i sar. (2004) su izučavali uticaj koncentracije alginata na parametre fermentacije i karakteristike kuglica alginata, pri čemu su zaključili da se pri nižoj koncentraciji alginata (<1,5%) formiraju meke kuglice čija se struktura lako narušava tokom fermentacije, dok se povećanjem koncentracije alginata na 2-5% (m/m) ne narušava struktura kuglica. Pored toga fermentacijom uz primenu kuglica sa povišenom koncentracijom alginata iznad 3% dolazi do otežanog usvajanja šećera, nižih prinosa i produktivnosti etanola, dok pri koncentraciji alginata od 6% (m/m) dolazi do opadanja metaboličkih aktivnosti ćelija. Takođe, primenom mekih kuglica tokom fermentacije šećera dolazi do problema usled intenzivnog rasta imobilisanih ćelija kvasca, što za posledicu ima povećanje prečnika kuglica. Prema rezultatima ovih autora primenom imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata prečnika 5,1 mm formiranih od 2% (m/m) Na-alginata tokom alkoholne fermentacije dolazi do pucanja kuglica nosača, dok primenom kuglica prečnika 1,3-3,7 mm nije došlo do narušavanja strukture kuglica.

Na slikama 4.20.-4.26. su prikazani parametri fermentacije (S_u , Y_s , P , $Y_{p/s}$, $E_{p/s}$, Q_p) nakon fermentacije podloga od melase i gustog soka različite početne koncentracije šećera (100-300 g/l) primenom slobodnih ćelija kvasca i imobilisanih umrežavanjem u kuglicama Ca-alginata.



Slika 4.20. Količina usvojenog šećera (S_u) nakon fermentacije melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera (S_o), primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

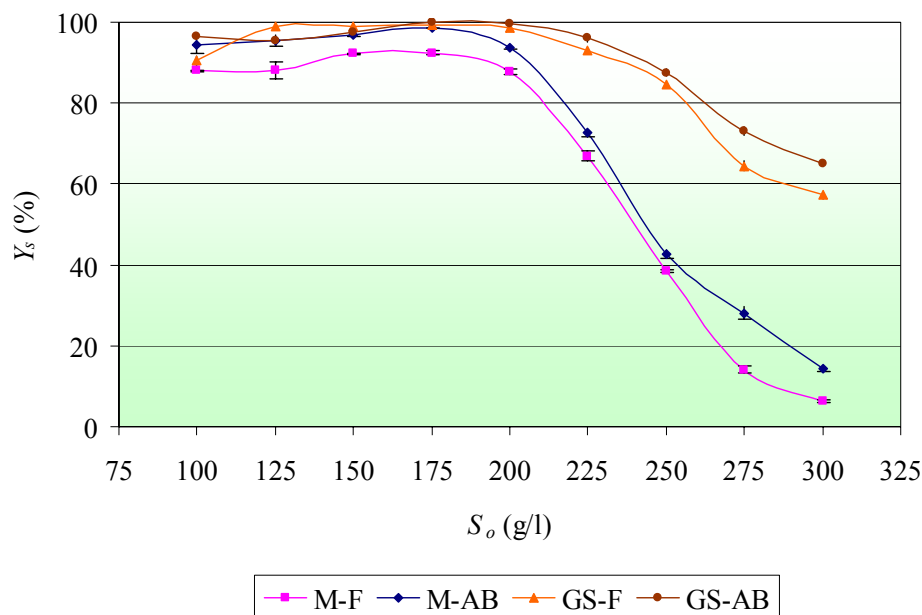
Rezultati prikazani na slici 4.20. potvrđuju da se povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi (S_o) od melase od 100 g/l do 200 g/l povećava količina usvojenog šećera od 88,2 g/l do 174,7 g/l od strane slobodnih ćelija i od 95,6 g/l do 188,1 g/l od strane imobilisanih ćelija kvasca. Daljim povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi od melase do 300 g/l naglo se smanjuje količina usvojenog šećera na svega 20,1 g/l za slobodne ćelije i na 44,6 g/l za imobilisane ćelije kvasca. Povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi od gustog soka od 100 g/l do 250 g/l povećava se količina usvojenog šećera od 91,3 g/l do 211,7 g/l, za slobodne i od 96,5 g/l do 220,4 g/l za imobilisane ćelije kvasca. Daljim povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi od gustog soka na 300 g/l smanjuje se količina usvojenog šećera na 173,2 g/l, za slobodne ćelije, odnosno na 196,7 g/l za imobilisane ćelije.

Količina usvojenog šećera od strane slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca nakon fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 100-225 g/l se ne razlikuje značajno ($p > 0,05$), pa se može zaključiti da pri standardnim uslovima koncentracije šećera imobilizacija nema uticaja na sposobnost usvajanja ćelija kvasca. Nasuprot tome, u uslovima visoke koncentracije šećera u podlozi (250-300 g/l) imobilisane ćelije usvoje značajno više ($p < 0,05$) šećera iz gustog soka od slobodnih ćelija kvasca. Tokom fermentacije melase početne koncentracije šećera 125-300 g/l slobodne ćelije kvasca su pokazale nižu ($p < 0,05$) sposobnost usvajanja šećera od imobilisanih. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da u VHG uslovima fermentacije melase i gustog soka, odnosno pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi iznad 250 g/l, imobilisane ćelije kvasca imaju bolju sposobnost usvajanja šećera od slobodnih. Pri VHG uslovima ćelije kvasca su

izložene osmotskom stresu usled čega je ugrožena njihova metabolička aktivnost i sposobnost usvajanja šećera pa time i glikoliza (Thomas i Ingledew, 1992). Međutim, usled gradijenta koncentracije, gustine ćelija kvasca i zaštitnog dejstva samog polimera ćelije kvasca imobilisane u unutrašnjosti kuglica Ca-alginata su zaštićene od osmotskog stresa (Phisalopong i sar., 2007; Nedović, 1999).

Poređenjem količine usvojenog šećera iz melase i gustog soka može se zapaziti da slobodne i imobilisane ćelije, pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi 200-300 g/l, usvoje više šećera iz gustog soka nego iz melase. Priprema podloga sa višim sadržajem šećera podrazumeva dodatak veće količine sirovine čime se povećava i količina nešećernih komponenti u podlozi. Analizom hemijskog sastava melase i gustog soka je prethodno utvrđeno da melasa sadrži višestruko veću količinu mineralnih materija, rastvorljivih soli i bojnih komponenti od gustog soka. Ova jedinjenja pored povišene koncentracije šećera doprinose osmotskom stresu i mogu imati inhibitorno dejstvo na metabolizam kvasca. Ovo navodi na zaključak da je razlika u sadržaju nešećernih materija u melasi i gustom soku osnovni uzrok navedenih razlika u količini usvojenog šećera. Na osnovu razlike u količini usvojenog šećera iz melase i gustog soka, može se pretpostaviti da pojedine nešećerne komponente melase negativno utiču na metabolizam slobodnih ćelija kvasca već pri koncentraciji šećera u podlozi od 175 g/l.

Stepen konverzije šećera (Y_s) nakon fermentacije melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera 100-300 g/l primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB) su prikazani na slici 4.21.



Slika 4.21. Stepen konverzije šećera (Y_s) nakon fermentacije melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera (S_o), primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

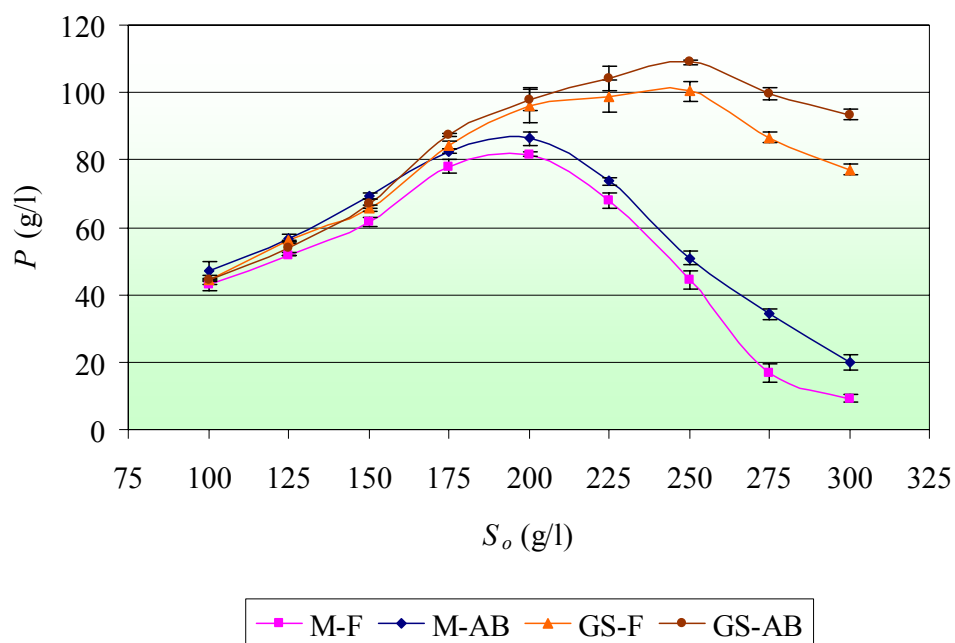
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 4.21. može se zapaziti da porastom početne koncentracije šećera u podlozi (S_0) od 100 do 175 g/l raste i stepen konverzije šećera iz melase (Y_s) od 88,2% do 92,45% primenom slobodnih ćelija kvasca i od 94,3% do 98,7% primenom imobilisanih ćelija kvasca. Daljim povećanjem početne koncentracije šećera do 300 g/l opada i stepen konverzije šećera melase na svega 6,4% primenom slobodnih ćelija i na 14,4% primenom imobilisanih ćelija kvasca. Slično tome, u fermentaciji gustog soka povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi od 100 do 175 g/l povećava se vrednost Y_s od 90,5% do 99,1% primenom slobodnih ćelija kvasca i od 96,4% do 99,8% primenom imobilisanih ćelija. Daljim povećanjem početne koncentracije šećera do 300 g/l opada i stepen konverzije šećera gustog soka na 57,2% primenom slobodnih ćelija i 65,0% primenom imobilisanih ćelija kvasca. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se pri početnim koncentracijama šećera 100-175 g/l u podlogama od melase i gustog soka iskoristi gotovo sav prisutan šećer. Povećanjem početne koncentracije šećera iznad 200 g/l u podlogama od melase i gustog soka opada stepen konverzije šećera. Pri tome je pad stepena konverzije šećera iz melase značajno izraženiji nego za gusti sok, tako da već pri početnoj koncentraciji šećera 250 g/l u podlogama od melase više od polovine šećera iz podloge ostaje neiskorišćeno. Usled toga se može smatrati da melasa nije pogodna sirovina za alkoholnu fermentaciju u VHG uslovima koncentracije šećera. Količina šećera koju proizvodni mikroorganizam ne usvoji tokom fermentacije, nakon izdvajanja etanola destilacijom, ostaje u džibri i predstavlja gubitak sa stanovišta proizvodnje etanola i veliko organsko opterećenje koje u značajnoj meri doprinosi narušavanju kvaliteta životne sredine u koju se odlaže. Kao alternativno rešenje nameće se recirkulacija džibre u proces pripreme sveže podloge. Pored toga, prema nedavno objavljenim rezultatima u radu Lin i sar. (2011) primenom aeracije (0,82 l/min) glukozne podloge (300 g/l šećera) u logaritamskoj fazi rasta kvasca tokom VHG fermentacije moguće je ostvariti potpuno iskorišćenje prisutnog šećera uz povećanje produktivnosti etanola primenom slobodno suspendovanih ćelija kvasca.

Zavisnost koncentracije etanola (P) od početne koncentracije šećera u podlozi (S_0) (Slika 4.22.) je u saglasnosti sa gore prikazanim rezultatima usvajanja šećera. Povećanjem koncentracije početnog šećera u podlozi od melase od 100 g/l do 200 g/l povećava se koncentracija etanola od 42,8 g/l do 81,7 g/l primenom slobodnih i od 47,1 g/l do 86,4 g/l primenom imobilisanih ćelija kvasca. Daljim povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi od melase do 300 g/l naglo opada koncentracija etanola u fermentisanoj podlozi na 9,1 g/l za slobodne ćelije i na 20,1 g/l za imobilisane ćelije kvasca.

U slučaju fermentacije gustog soka, povećanjem koncentracije početnog šećera u podlozi od 100 g/l do 250 g/l povećava se koncentracija etanola od 44,4 g/l do 100,4 g/l primenom slobodnih i od 44,3 g/l do 109,5 g/l primenom imobilisanih ćelija kvasca. Daljim povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi od gustog soka na 300 g/l opada koncentracija etanola u fermentisanoj podlozi do 77,1 g/l za slobodne ćelije i do 93,5 g/l za imobilisane ćelije kvasca. Prema rezultatima Luong i sar., (1985) pri koncentraciji etanola od 112 g/l dolazi do inhibicije rasta slobodnih ćelija *S. cerevisiae* (ATCC 4126), dok pri koncentraciji od 115 g/l dolazi do potpune inhibicije proizvodnje etanola. Međutim, novija istraživanja potvrđuju da se primenom slobodnih ćelija *S. cerevisiae* (1×10^8 ćelija/ml) za fermentaciju podloge sa početnim sadržajem šećera 280 g/l pripremljene od soka slatkog

sirka uz dodatak saharoze postiže koncentracija etanola od 113 g/l bez suplementacije nutrijenata u podlogu za fermentaciju (Nuanpeng i sar., 2011). Prinos etanola ostvaren primenom slobodnih ćelija u VHG fermentaciji dekstrozne podloge (300 g/l šećera) bez suplementacije nije prelazio 100 g/l, a kada je ova podloga obogaćena dodatkom prosa (*Eleusine coracana* L) ostvarena koncentracija etanola iznosila 150 g/l (Reddy i Reddy, 2006).

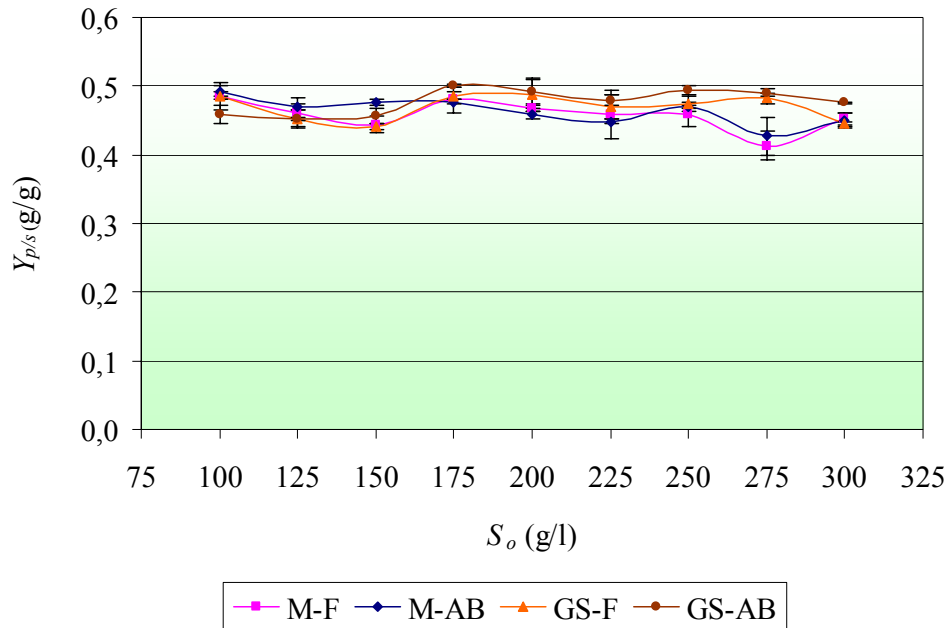
Poređenjem koncentracije etanola u fermentisanim podlogama od melase i gustog soka, pri početnim koncentracijama šećera 100-200 g/l, pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca ostvaruju se relativno slične koncentracije etanola. Pri početnoj koncentraciji šećera 250-300 g/l pomoću imobilisanih ćelija postižu se više koncentracije etanola od slobodnih, usled efikasnijeg usvajanja šećera iz podloge.



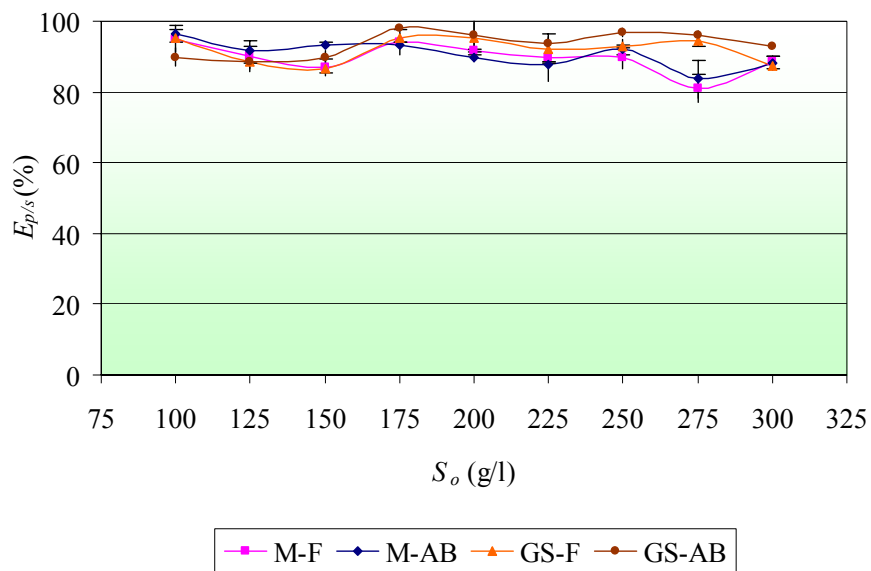
Slika 4.22. Koncentracija etanola (P) nakon fermentacije melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera (S_o), primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

Analizirajući zavisnosti prinosa etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) i efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) melase i gustog soka od početne koncentracije šećera (S_o) u podlogama (Slika 4.23. i Slika 4.24.) može se zaključiti da početna koncentracija šećera u podlozi, priroda sirovine (melasa i gusti sok) i sama imobilizacija nemaju definisan uticaj na vrednosti $Y_{p/s}$ i $E_{p/s}$ pa samim tim ni na konverziju šećera u etanol odnosno na fermentativnu aktivnost ćelija kvasca u ispitivanim fermentacionim sistemima. Fermentacijom melase primenom slobodnih ćelija kvasca postižu se srednje vrednosti prinosa etanola na usvojeni šećer od 0,414 g/g do 0,486 g/g što odgovara efikasnosti od 80,9% do 95,0%, dok se primenom imobilisanih ćelija postižu prinosi od 0,427 g/g do 0,493 g/g što odgovara efikasnosti od

83,6% do 96,4%. Fermentacijom gustog soka primenom slobodnih ćelija kvasca postižu se prinosi etanola na usvojeni šećer od 0,442 g/g do 0,487 g/g što odgovara efikasnosti od 86,4% do 95,3%, dok se primenom imobilisanih ćelija postižu prinosi od 0,458 g/g do 0,501 g/g što odgovara efikasnosti od 89,5% do 98,0%.



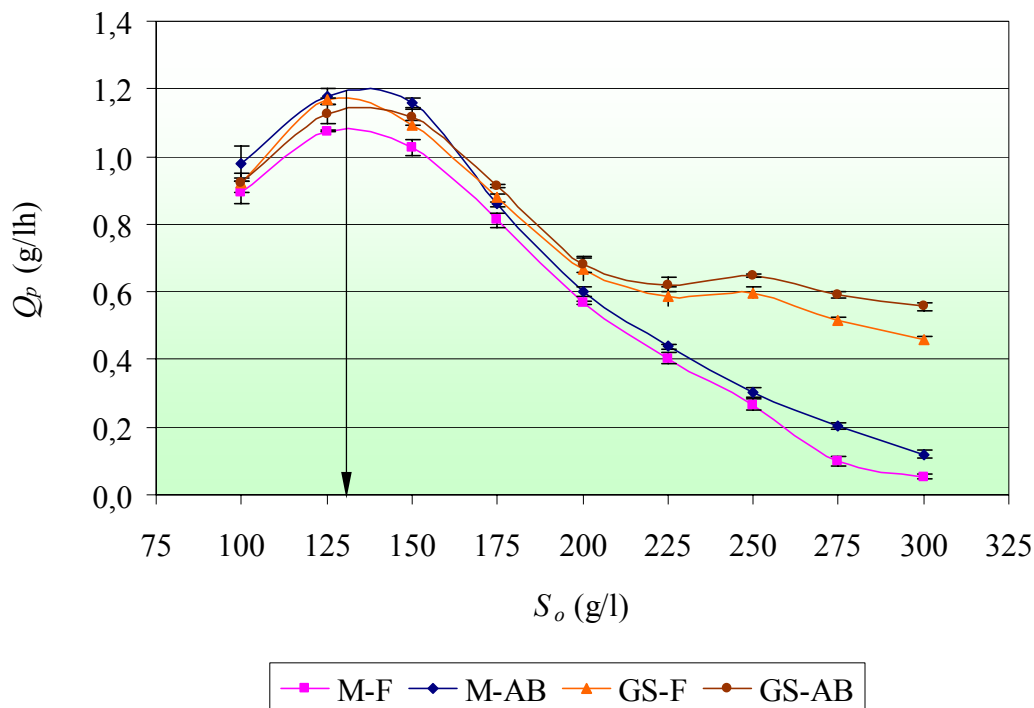
Slika 4.23. Prinos etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) nakon fermentacije melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera 100-300 g/l primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).



Slika 4.24. Efikasnost fermentacije ($E_{p/s}$) melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera 100-300 g/l primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

Parametar koji predstavlja merilo brzine fermentacije je volumetrijska produktivnost etanola (Q_p). Prinosi etanola i trajanje fermentacije u velikoj meri zavise od početne koncentracije šećera, pa samim tim i produktivnost etanola u ispitivanim sistemima, takođe, zavisi od početne koncentracije šećera (Slika 4.25.). Najviša produktivnost etanola ostvarena je fermentacijom melase i gustog soka početne koncentracije šećera 125 g/l, kako pomoću slobodnih tako i pomoću imobilisanih ćelija kvasca. Pri fermentaciji melase početne koncentracije šećera 125 g/l postignuta je maksimalna produktivnost etanola 1,07 g/lh primenom slobodnih i 1,18 g/lh primenom imobilisanih ćelija kvasca. Prilikom fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 125 g/l ostvarena je maksimalna produktivnost etanola od 1,17 g/lh i 1,13 g/lh, primenom slobodnih odnosno imobilisanih ćelija kvasca.

Analiziranjem funkcionalne zavisnosti produktivnosti etanola od početne koncentracije šećera može se zaključiti da je u ispitivanim sistemima optimalna koncentracija šećera za ostvarivanje maksimalne produktivnosti etanola od 125 g/l do 150 g/l. Povećanjem početne koncentracije šećera iznad 150 g/l dolazi do naglog opadanja produktivnosti etanola u svim ispitivanim sistemima. Na osnovu prikazanih rezultata može se ustanoviti da se od ispitivanih fermentacionih sistema, najviša moguća produktivnost etanola od 1,2 g/lh može postići alkoholnom fermentacijom melase pomoću ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata pri optimalnoj koncentraciji šećera u podlozi od 130 g/l.



Slika 4.25. Produktivnost etanola (Q_p) nakon fermentacije podloga od melase (M) i gustog soka (GS) početne koncentracije šećera (100-300 g/l) primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

Analiziranjem pH vrednosti fermentisanih podloga od melase i gustog soka (Tabele 4.23-4.26.) može se zapaziti da su pH vrednosti relativno slične u sistemima sa slobodnim ćelijama kvasca (od 5,2 do 5,4 za melasu i od 4,6 do 4,9 za gusti sok) u odnosu na sisteme sa imobilisanim ćelijama kvasca (od 5,2 do 5,3 za melasu i od 4,4 do 4,9 za gusti sok). Takođe se može zaključiti da je pad vrednosti pH tokom fermentacije sa početne vrednosti 5,5 znatno izraženiji u podlogama od gustog soka nego od melase. Ovakav rezultat je posledica pufernog svojstva melase. Na osnovu vrednosti pH fermentisanih podloga na bazi melase i gustog soka može se zaključiti da korekcija pH vrednosti podloga tokom fermentacije nije neophodna budući da kvasci efikasno proizvode etanol pri vrednostima pH u opsegu 3,5-6 (Roehr, 2001).

Provodljivost i otpornost fermentisanih podloga (Tabele 4.22. do 4.25.) na bazi melase i gustog soka su u međusobnoj saglasnosti i u saglasnosti sa rezultatima sadržaja rastvorljivih soli (TDS). Nakon fermentacije pomoću slobodnih ćelija fermentisane podloge na bazi melase imaju viši sadržaj rastvorljivih soli (7,7-17,1 g/l) u poređenju sa fermentisanim podlogama na bazi gustog soka (2,1-3,9 g/l), što je u saglasnosti sa hemijskim sastavom sirovina. Takođe je nakon fermentacije pomoću imobilisanih ćelija kvasca u podlogama od melase utvrđen viši sadržaj rastvorljivih soli (9,1-14,5 g/l) u poređenju sa podlogama od gustog soka (2,4-3,9 g/l), istog početnog sadržaja šećera. Sadržaj rastvorljivih soli (TDS) fermentisanih podloga primenom slobodnih i imobilisanih ćelija je u saglasnosti sa koncentracijom etanola, pa se može pretpostaviti da jedan deo

rastvorljivih soli u fermentisanoj podlozi nastaje kao proizvod metabolizma kvasca. Visok sadržaj rastvorljivih soli, od kojih najveći deo čine neorganske soli, u podlogama na bazi melase doprinosi povećanju osmotskog pritiska koji stvara osmotski stres kod ćelija kvasca. Ovo dovodi do inhibicije usvajanja šećera, ćelijskog rasta i alkoholne fermentacije. Osmotski stres kvasca inhibira usvajanje hranljivih materija, sintezu proteina uključujući ribozomalne proteine i funkciju mnogih gena u ćelijama *S. cerevisiae* (Gasch i sar. 2000). Pored toga, osmotski stres izaziva otpuštanje vode iz ćelija *S. cerevisiae* i njihovu dehidrataciju što u velikoj meri utiče na njihov rast, a takođe dovodi do blokiranja ćelijskog ciklusa rasta inhibiranjem regulacije Gln3p-Cdc28p kinaze ili inhibiranjem aktivnosti Clb2p-Cdc28p kinaze (Bai i Zhao, 2012).

Tabela 4.22. Vrednost pH, provodljivost, otpornost i sadržaj ukupnih rastvorljivih soli (TDS) fermentisanih podloga na bazi melase primenom slobodnih ćelija kvasca.

S_o (g/l)	pH	Provodljivost (mS/cm)	Otpornost (Ω cm)	TDS (g/l)
100	5,2	21,2	55	10,3
125	5,3	25,3	40	14,6
150	5,3	29,3	34	17,1
175	5,4	24,3	41	14,5
200	5,4	25,0	40	13,9
225	5,4	24,2	41	13,9
250	5,4	21,8	46	12,4
275	5,4	15,2	66	8,4
300	5,3	13,9	72	7,7

Tabela 4.23. Vrednost pH, provodljivost, otpornost i sadržaj ukupnih rastvorljivih soli (TDS) fermentisanih podloga na bazi melase primenom ćelija kvasca imobilisanim u kuglicama Ca-alginata.

S_o (g/l)	pH	Provodljivost (mS/cm)	Otpornost (Ω cm)	TDS (g/l)
100	5,2	16,2	62	9,1
125	5,2	17,8	56	10,1
150	5,3	19,5	51	11,1
175	5,3	24,2	41	14,0
200	5,3	25,0	40	14,5
225	5,2	23,4	43	13,4
250	5,2	23,2	43	13,3
275	5,2	22,8	44	13,1
300	5,2	19,7	51	9,4

Tabela 4.24. pH vrednost, provodljivost, otpornost i sadržaj ukupnih rastvorljivih soli (TDS) fermentisanih podloga na bazi gustog soka primenom slobodnih ćelija kvasca.

S_o (g/l)	pH	Provodljivost (mS/cm)	Otpornost (Ω cm)	TDS (g/l)
100	4,6	3,9	255	2,1
125	4,6	4,3	229	2,4
150	4,8	5,4	185	2,9
175	4,8	5,8	173	3,1
200	4,8	6,3	160	3,4
225	4,9	6,8	148	3,7
250	4,9	7,1	142	3,9
275	4,9	7,0	143	3,8
300	4,9	6,8	147	3,7

Tabela 4.25. pH vrednost, provodljivost, otpornost i sadržaj ukupnih rastvorljivih soli (TDS) fermentisanih podloga na bazi gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanim u kuglicama Ca-alginata.

So (g/l)	pH	Provodljivost (mS/cm)	Otpornost (Ω cm)	TDS (g/l)
100	4,4	4,5	224	2,4
125	4,5	5,0	199	2,7
150	4,6	5,8	173	3,1
175	4,7	6,0	167	3,3
200	4,7	6,2	160	3,4
225	4,8	6,5	153	3,6
250	4,9	7,0	141	3,9
275	4,9	7,0	143	3,8
300	4,9	6,7	150	3,6

U tabeli 4.26. je prikazan ukupan broj ćelija kvasca kao i procenjeni udeo viabilnih ćelija kvasca u fermentisanoj podlozi nakon fermentacije melase i gustog soka primenom slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca. Na osnovu rezultata iz tabele 4.26. može se zaključiti da je u fermentacionim sistemima sa slobodnim ćelijama kvasca prisutan veći broj ćelija kvasca u tečnoj fazi nego u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca. Ovo može biti posledica mehaničke izolacije ćelija kvasca u kuglicama alginata čime je donekle ograničen ćelijski rast, ali nije u potpunosti sprečen. Udeo viabilnih ćelija kvasca u fermentacionim sistemima sa imobilisanim ćelijama je nešto viši nego u sistemima sa slobodnim ćelijama, što potvrđuje činjenicu da Ca-alginat djeluje kao zaštita ćelijama kvasca od nepovoljnih uticaja komponenti iz fermentacione podloge. Ukupan broj ćelija kvasca u fermentisanim podlogama na bazi gustog soka je viši nego u fermentisanim

podlogama na bazi melase. Ovo potvrđuje da hemijski sastav gustog soka više pogoduje rastu ćelija kvasca u poređenju sa melasom. Pored toga, udeo viabilnih ćelija (slobodnih i imobilisanih) u fermentisanim podlogama od gustog soka je viši nego u podlogama od melase. Ovo potvrđuje tvrdnju da nešećerne materije iz melase nepovoljno utiču na metaboličke funkcije ćelija kvasca, naročito pri visokim koncentracijama. Nakon fermentacije melase početnog sadržaja šećera 300 g/l udeo živih ćelija u sistemu sa slobodnim odnosno sa imobilisanim ćelijama iznosi 63,9% odnosno 76,7%, dok pri istim uslovima fermentacije gustog soka udeo viabilnih ćelija iznosi 82,4% odnosno 88,7%.

Tabela 4.26. Broj ćelija kvasca i udeo viabilnih ćelija kvasca u fermentisanim podlogama od melase i gustog soka na kraju fermentacije primenom slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca.

Sirovina	Početni šećer, S_0 (g/l)	Slobodne ćelije kvasca		Imobilisane ćelije kvasca	
		Broj ćelija ($\times 10^{-8}$)/ ml	Udeo viabilnih ćelija (%)	Broj ćelija ($\times 10^{-8}$)/ ml	Udeo viabilnih ćelija (%)
Melasa	100	4,30	97,8	1,13	97,2
	125	3,83	92,5	1,27	94,1
	150	3,70	90,7	1,11	92,9
	175	3,40	84,1	1,06	92,0
	200	3,13	83,9	1,19	91,8
	225	2,27	76,0	1,24	89,5
	250	1,83	68,2	1,05	88,8
	275	1,50	65,4	1,86	84,2
	300	1,74	63,9	1,61	76,7
Gusti sok	100	4,95	95,5	1,58	100,0
	125	5,35	92,9	1,46	100,0
	150	4,80	91,9	1,48	98,3
	175	4,95	91,3	1,17	95,7
	200	4,03	91,0	1,17	95,2
	225	4,50	89,7	1,16	94,3
	250	4,55	88,9	1,51	94,2
	275	4,70	87,5	1,59	91,3
	300	4,25	82,4	1,82	88,7

4.2.7. Fermentacija melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata

Osmotska dehidracija voća i povrća u koncentrovanim rastvorima šećera kao što je melasa je atraktivna mogućnost da se na ekonomičan način iskoristi ovaj nusproizvod tehnologije šećera. U toku procesa osmotske dehidracije voća i povrća dolazi do difuzije vode i komponenti ćelijskih sokova iz voća i povrća u melasu i obrnuto (Erle i Schubert, 2001). Odlaganje melase koja preostaje nakon osmotske dehidracije voća i povrća u životnu okolinu je ekološki nepoželjno. U cilju što racionalnijeg iskorišćenja ovog nusproizvoda u radu je ispitan kvalitet melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve kao i potencijal njihove primene kao sirovina za proizvodnju etanola primenom slobodnih i imobilisanih ćelija *S. cerevisiae* (DTN) u kuglicama Ca-alginata. Parametri kvaliteta i parametri fermentacije melasa koje preostaju nakon osmotske dehidracije kupusa (M1) i mrkve (M2) su upoređeni sa parametrima kvaliteta i fermentacije početne melase (M0).

U tabeli 4.28. su prikazani parametri kvaliteta početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa (M1) i osmotske dehidracije mrkve (M2).

Tabela 4.27. Parametri kvaliteta početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa (M1) i osmotske dehidracije mrkve (M2).

Parametar	M0	M1	M2
Bg ^o (17,5°C)	82	72	70
Suva masa (% m/m)	83,1 ± 0,3	72,3 ± 0,7	61,3 ± 1,5
Ukupni šećer (% m/m s.m.)	70,0 ± 0,5	66,9 ± 1,6	67,4 ± 2,3
Pepeo (% m/m s.m.)	9,9 ± 0,9	11,5 ± 0,1	13,9 ± 0,6
Ukupni azot (% m/m s.m.)	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,0
Ukupni proteini po Kjeldahl-u			
N x 6,25 (% m/m s.m.)	13,8 ± 0,3	14,6 ± 0,6	14,4 ± 0,3
Aminoazot (% m/m s.m.)	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,08	0,25 ± 0,09

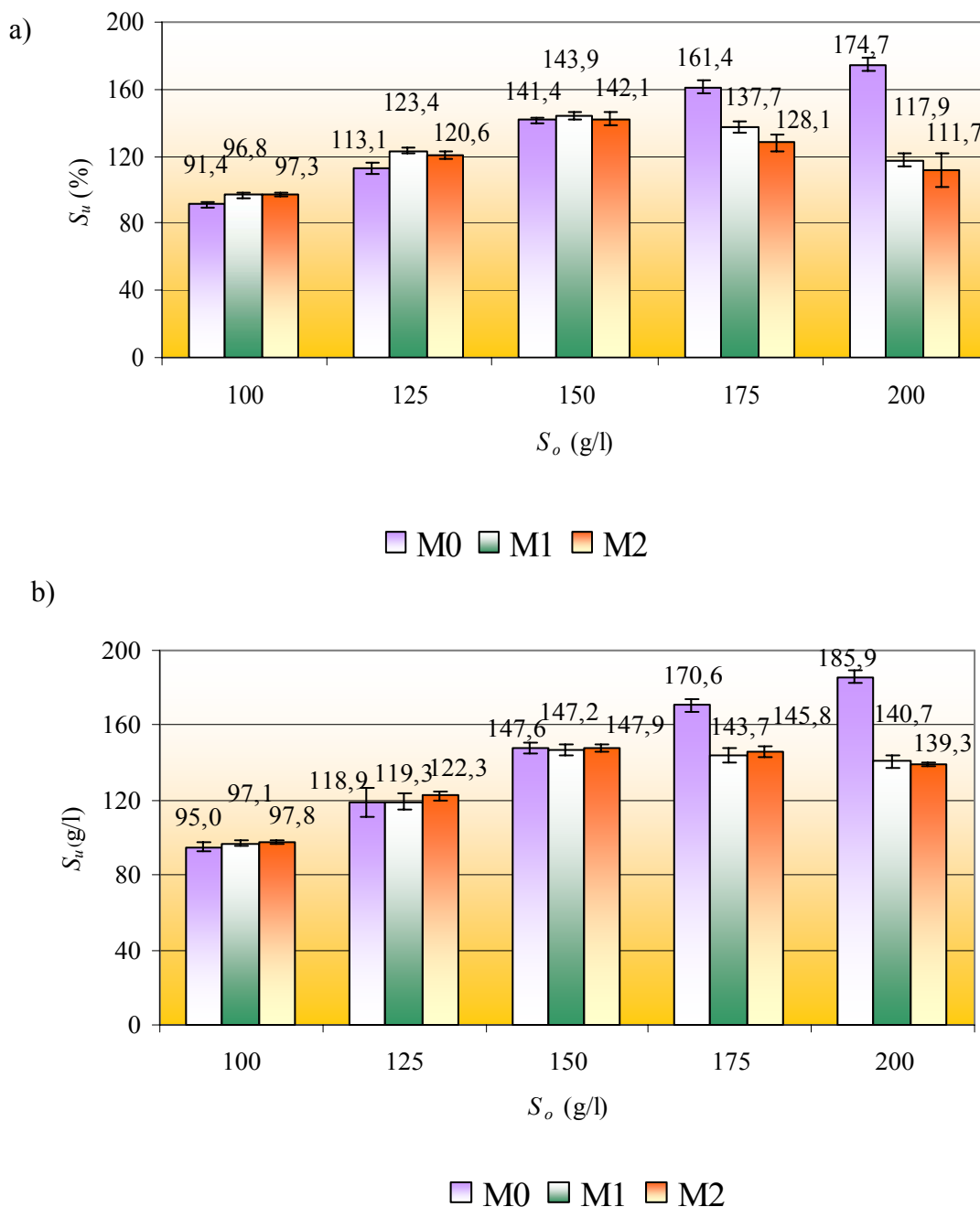
Analizom parametara kvaliteta melase može se zaključiti da melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa (M1) i mrkve (M2) imaju viši sadržaj vode od polazne melase (M0), pa samim tim i niži viskozitet. Zahvaljujući višem sadržaju vode u melasi M1 i M2 omogućena je ušteda vode za pripremu podloge za fermentaciju, ali i energije potrebne za mešanje podloge i rastvaranje melase. Tokom osmotske dehidracije, šećer iz melase difunduje u povrće i dolazi do smanjenja sadržaja šećera na suhu materiju melase sa 70,0%, za melasu M0 na 66,9% za melasu M1 i 67,4% za melasu M2. Usled difuzije mineralnih materija iz povrća u melasu sadržaj pepela u suvoj masi melase M1 (11,5%) i M2 (13,9%) je viši ($p < 0,05$) nego u suvoj masi melase M0 (9,9%). Sadržaj azota, proteina i aminoazota u suvoj masi melase M0, M1 i M2 se međusobno ne razlikuje značajno

($p > 0,05$). Analizirajući prikazane parametre kvaliteta može se zaključiti da se tokom osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve povećava sadržaj vode u melasi šećerne repe, smanjuje sadržaj ukupnih šećera u suvoj masi melase, povećava sadržaj mineralnih materija, a sadržaj azotnih jedinjenja ne menja značajno.

Kako bi se ispitao uticaj početne koncentracije šećera u podlozi na parametre fermentacije fermentisane su melase M0, M1 i M2 početnog sadržaja šećera 100-200 g/l. Parametri fermentacije melase M0, M1 i M2 su prikazani na slikama 4.26-4.29. U cilju ispitivanja uticaja difuzije komponenata povrća tokom osmotske dehidracije na proces fermentacije ostvareni parametri fermentacije početne melase (M0) su upoređeni sa parametrima fermentacije melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa (M1) i mrkve (M2).

Na slici 4.26. je prikazana količina usvojenog šećera (S_u) nakon fermentacije početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidracije mrkve (M2). Analizirajući podatke prikazane na slici 4.26. može se zaključiti da u sistemu sa slobodnim i u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca porastom početne koncentracije šećera u podlozi (S_o) od 100 do 200 g/l, raste i količina usvojenog šećera (S_u) iz melase M0. Prilikom fermentacije melase M0 početne koncentracije šećera 200 g/l slobodne ćelije kvasca su usvojile 174,7 g/l šećera, a imobilisane 185,9 g/l šećera. Fermentacijom melase M1 i M2, porastom početne koncentracije šećera u podlozi od 100 do 150 g/l raste količina usvojenog šećera, kako u sistemu sa slobodnim tako i u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca. Međutim, daljim povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi do 200 g/l dolazi do opadanja količine usvojenog šećera i u sistemu sa slobodnim i imobilisanim ćelijama kvasca. Prilikom fermentacije melase M1 i M2 početne koncentracije šećera 150 g/l slobodne ćelije kvasca su usvojile 143,9 g/l i 142,1 g/l šećera, a imobilisane 147,2 g/l i 147,9 g/l šećera

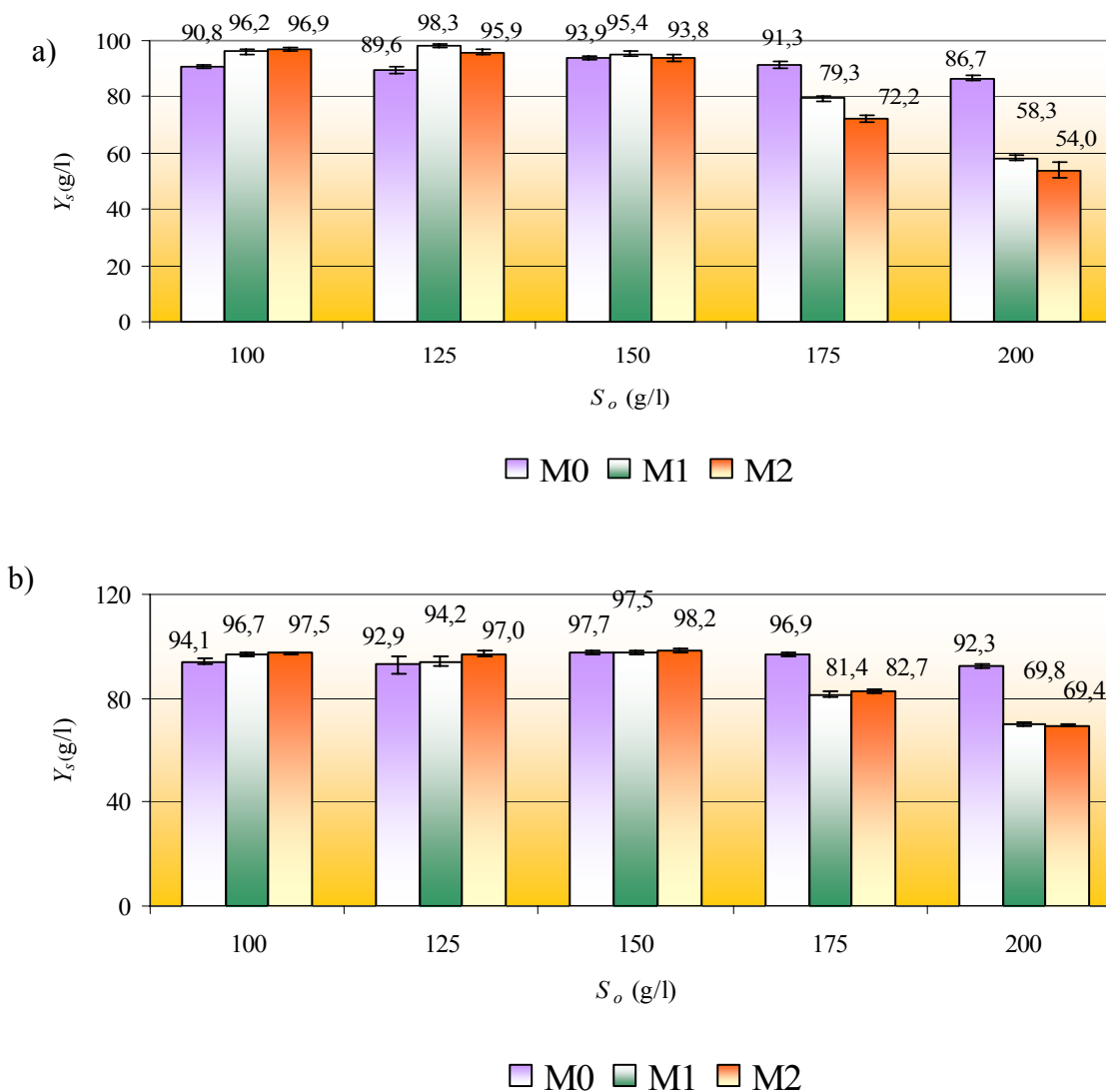
Poredeći vrednosti S_u za melasu M0, M1 i M2 može se zaključiti da pri početnim koncentracijama šećera u podlozi do 150 g/l kvasci usvajaju više šećera ($p < 0,05$) iz melase nakon osmotske dehidracije kupusa (M1) i mrkve (M2) nego iz polazne melase (M0). Nasuprot tome, pri početnoj koncentraciji šećera 175 g/l i 200 g/l količina usvojenog šećera iz melase M1 i M2 je izrazito niža ($p < 0,05$) u poređenju sa melasom M0. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da pojedine komponente koje tokom osmotske dehidracije difunduju iz povrća u melasu, pri malim koncentracijama u podlozi, doprinose efikasnijem usvajanju šećera od strane ćelija kvasca. Nasuprot tome, pri povišenoj koncentraciji komponente poreklom iz povrća imaju inhibitorno dejstvo na sposobnost usvajanja šećera od strane ćelija kvasca. Poredeći količinu usvojenog šećera u fermentacionim sistemima sa slobodnim i imobilisanim ćelijama može se zaključiti da su imobilisane ćelije usvojile značajno više ($p < 0,05$) šećera nego slobodne ćelije, posebno pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi iznad 150 g/l. Ovo može biti posledica zaštitnog dejstva samog Ca-alginata na ćelije kvasca, kao i posledica visoke koncentracije ćelija u kuglicama polimera.



Slika 4.26. Količina usvojenog šećera (S_u) nakon fermentacije početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidratacije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidratacije mrkve (M2), početne koncentracije šećera (100-200 g/l), primenom a) slobodnih ćelija kvasca i b) imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata.

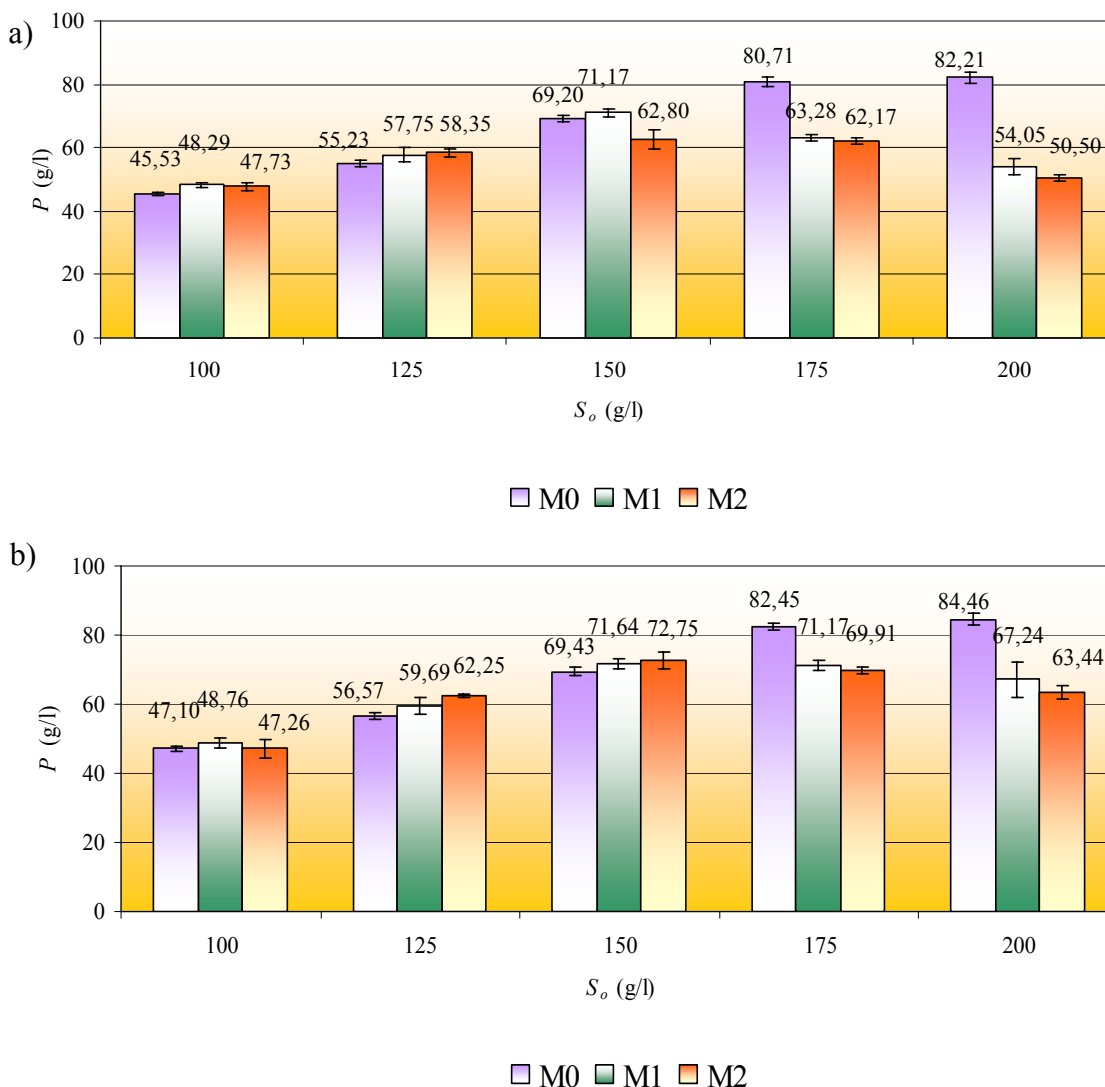
Stepen konverzije šećera (Y_s) iz melase M0, M1 i M2 je prikazan na slici 4.27. U fermentacionim sistemima sa slobodnim ćelijama kvasca najviši stepen konverzije šećera iz melase M0 (93,9%) ostvaren je pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi 150 g/l, iz melase M1 (98,3%) pri početnoj koncentraciji šećera 125 g/l, a iz melase M2 (96,2%) pri

početnoj koncentraciji šećera 100 g/l. U fermentacionom sistemu sa slobodnim ćelijama povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi iznad 150 g/l značajno opada stepen konverzije šećera sve tri ispitivane melase. U fermentacionim sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca najviši stepen konverzije šećera iz melase M0 (97,7%), M1(97,5%) i M2 (98,2%) ostvaren je pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi 150 g/l. Analizirajući vrednosti Y_s može se zaključiti da se pri početnoj koncentraciji šećera do 150 g/l utroši gotovo sav prisutan šećer iz sve tri ispitivane melase. Nakon fermentacije melase M1 i M2 početne koncentracije šećera 200 g/l primenom slobodnih, odnosno imobilisanih ćelija kvasca u fermentisanoj podlozi preostane neiskorišćeno više od 40% šećera, odnosno više od 30% šećera.



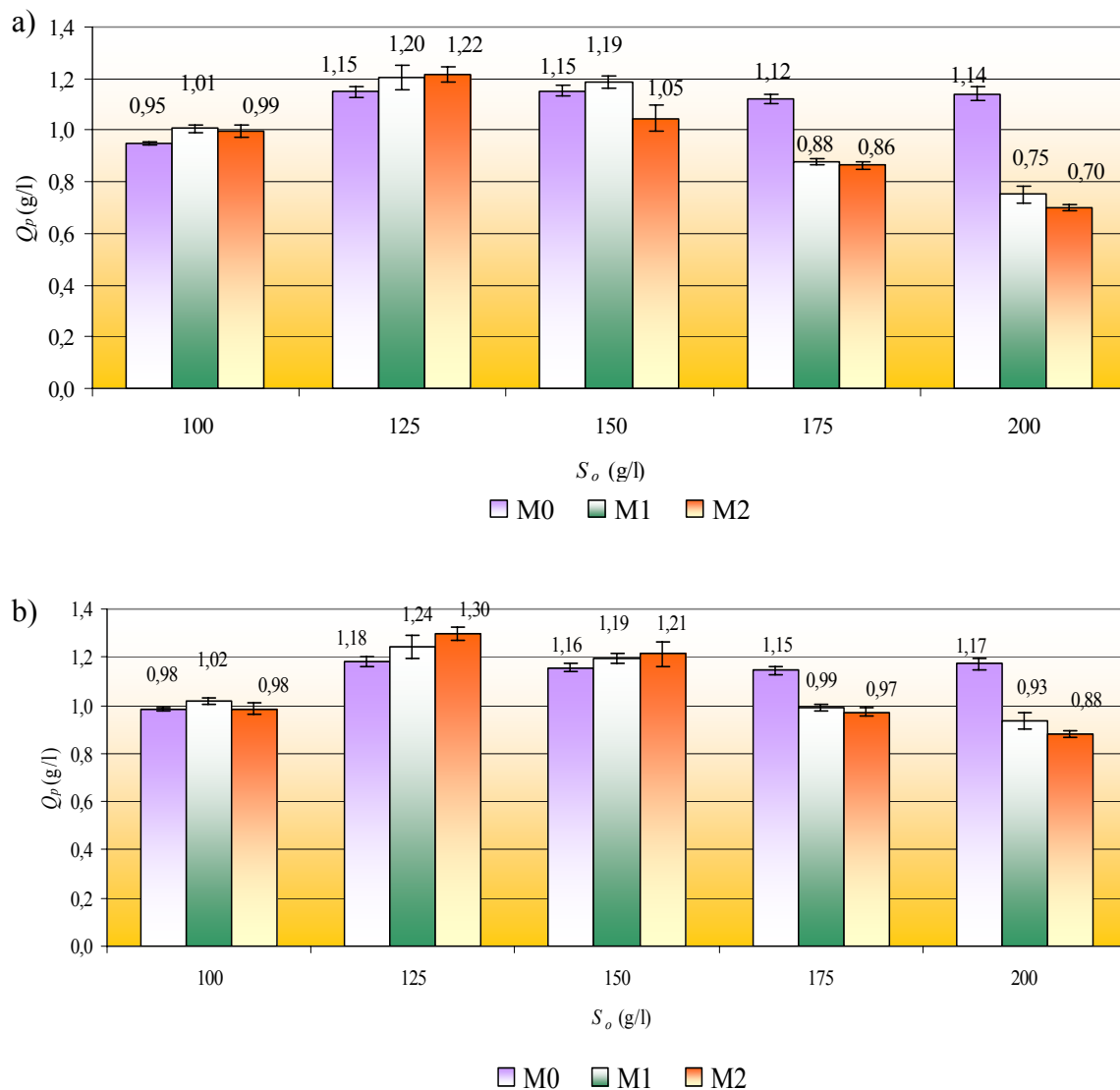
Slika 4.27. Stepen konverzije šećera (Y_s) nakon fermentacije početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidratacije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidratacije mrkve (M2), početne koncentracije šećera (100-200 g/l), primenom a) slobodnih ćelija kvasca i b) imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata.

Poređenjem koncentracije etanola (P) u fermentisanim podlogama (Slika 4.28.) i količine usvojenog šećera (S_u) iz podloga (Slika 4.26.) se može zaključiti da je količina nastalog etanola tokom fermentacije u saglasnosti sa količinom usvojenih šećera od strane ćelija kvasca. Fermentacijom melase M0, M1 i M2 primenom imobilisanih ćelija kvasca se ostvaruju više vrednosti koncentracije etanola nego primenom slobodnih ćelija kvasca, posebno za početne koncentracije šećera u podlozi 175 i 200 g/l. Fermentacijom melase M0, početne koncentracije šećera 200 g/l, primenom slobodnih ćelija kvasca je ostvarena najviša koncentracija etanola 82,21 g/l, a primenom imobilisanih ćelija kvasca 84,46 g/l. Fermentacijom melase M1 i M2, početnog sadržaja šećera 150 g/l, primenom slobodnih ćelija kvasca ostvarena je maksimalna koncentracija etanola 71,17 g/l i 62,80 g/l, a primenom imobilisanih ćelija 71,64 g/l i 72,75 g/l.



Slika 4.28. Koncentracija etanola (P) nakon fermentacije početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidratacije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidratacije mrkve (M2), početne koncentracije šećera (100-200 g/l), primenom a) slobodnih ćelija kvasca i b) imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata.

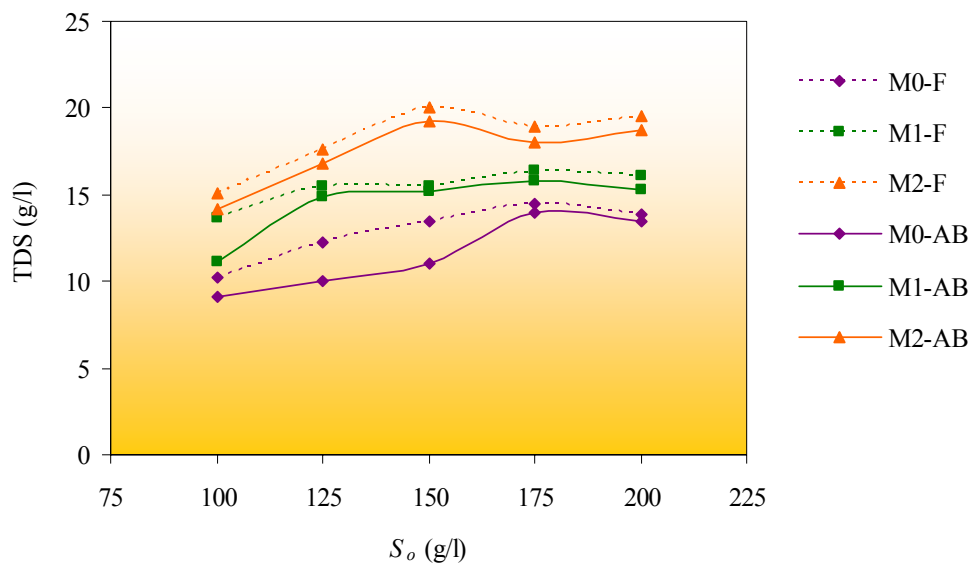
Povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi produžava se trajanje fermentacije. Fermentacije podoga na bazi melase M0, M1 i M2, sa istim početnim sadržajem šećera su trajale jednako dugo. Produktivnost etanola (Q_p) ostvarena fermentacijom melase M0, M1 i M2 primenom slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca je prikazana na slici 4.29 Fermentacijom melase M0, M1 i M2, početne koncentracije šećera 125 g/l primenom slobodnih ćelija kvasca je postignuta maksimalna produktivnost etanola 1,15 g/lh, 1,20 g/lh i 1,22 g/lh, a primenom imobilisanih ćelija 1,18 g/lh, 1,24 g/lh i 1,30 g/lh.



Slika 4.29. Produktivnost etanola (Q_p) nakon fermentacije početne melase (M0), melase nakon osmotske dehidratacije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidratacije mrkve (M2), početne koncentracije šećera (100-200 g/l), primenom: a) slobodnih ćelija kvasca i b) imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata.

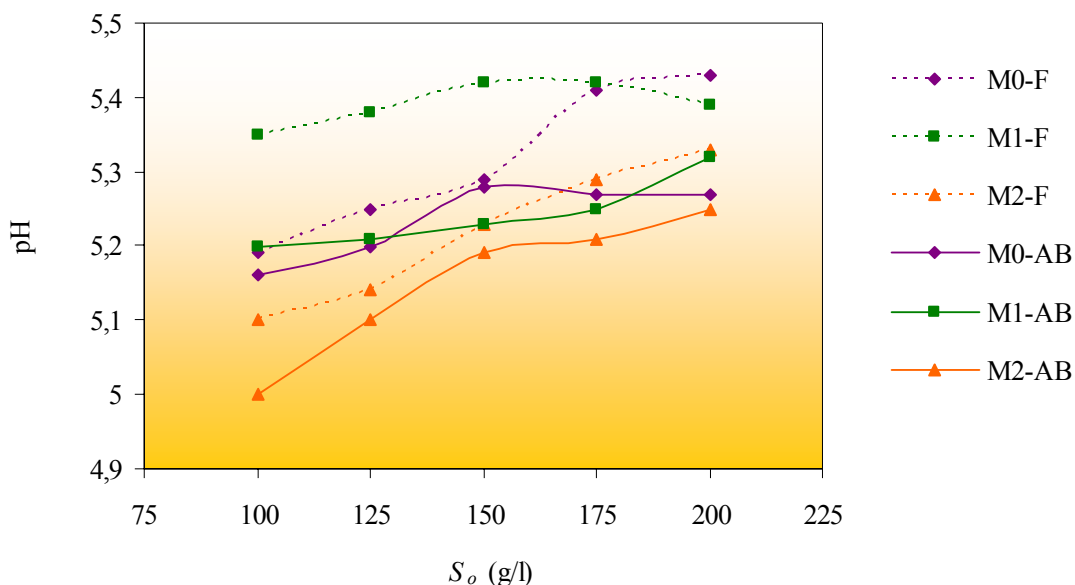
Prinos etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) iz melase M0, M1 i M2 u sistemu sa slobodnim i imobilisanim ćelijama kvasca se nije značajno razlikovao i nije bio u definisanoj funkcionalnoj zavisnosti od početne koncentracije šećera. Fermentacijom melase M0 su ostvarene srednje vrednosti $Y_{p/s}$ od 0,454 g/g do 0,500 g/g, što odgovara efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) od 88,9% do 97,9%. Fermentacijom melase M1 su ostvarene vrednosti $Y_{p/s}$ su od 0,458 g/g do 0,502 g/g, što odgovara efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) od 89,7% do 98,3%. Fermentacijom melase M2 su ostvarene vrednosti $Y_{p/s}$ od 0,442 g/g do 0,509 g/g, što odgovara efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) od 86,5% do 89,1%.

Analizirajući prikazane rezultate može se zaključiti da su melase M1 i M2 veoma dobre sirovine za proizvodnju etanola pri koncentracijama šećera u podlozi do 150 g/l, ali nisu pogodne sirovine za fermentaciju podloga sa višim sadržajem šećera pa samim tim ni za VHG fermentaciju. Razlog za ovo je činjenica da pojedine komponente poreklom iz povrća pri visokim koncentracijama inhibiraju usvajanje šećera od strane ćelija kvasca, pa samim tim i fermentaciju. U prilog ovoj konstataciji su i rezultati analize sadržaja ukupnih rastvorljivih soli (TDS) u fermentisanim podlogama na kraju fermentacije (Slika 4.30.). Analizirajući vrednosti TDS-a fermentisanih podloga se može zaključiti da je sadržaj rastvorljivih soli niži u fermentisanim podlogama na bazi melase M0, nešto viši u podlogama na bazi melase M1, a najviši u podlogama na bazi melase M2.



Slika 4.30. Sadržaj rastvorljivih soli (TDS) u fermentisanim podlogama nakon fermentacije polazne melase (M0), melase nakon osmotske dehidratacije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidratacije mrkve (M2) primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

Posmatranjem vrednosti pH fermentisanih podloga na bazi melase M0, M1 i M2 (Slika 4.31.) može se zaključiti da je u sistemima sa slobodnim ćelijama kvasca zabeležen manji pad vrednosti pH u odnosu na početnu pH podloga (5,5) nego u sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca. Najveći pad vrednosti pH u sistemu sa slobodnim i imobilisanim ćelijama je utvrđen tokom fermentacije melase M2, pa se može zaključiti da tokom fermentacije melase nakon osmotske dehidratacije mrkve kvasci proizvode više kiselina.



Slika 4.31. Vrednost pH fermentisanih podloga nakon fermentacije polazne melase (M0), melase nakon osmotske dehidratacije crvenog kupusa (M1) i melase nakon osmotske dehidratacije mrkve (M2) primenom slobodnih ćelija kvasca (F) i ćelija imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB).

4.2.8. Fermentacija melase primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK

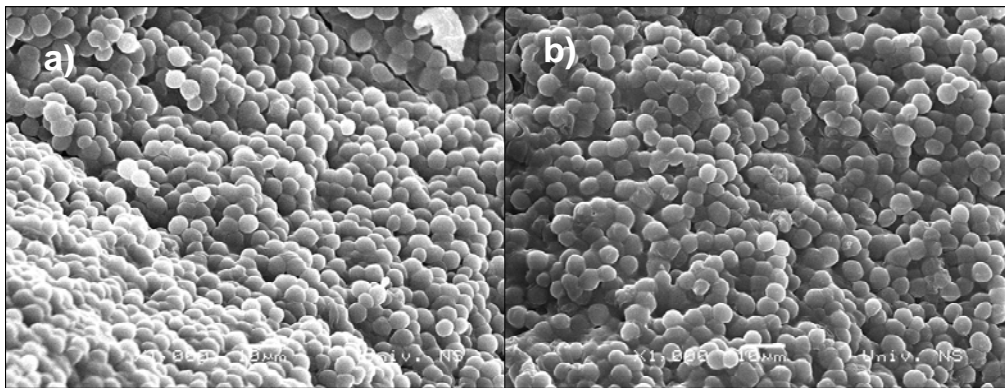
Osnovni nedostaci primene ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata u alkoholnoj fermentaciji su ograničeni prenos mase supstrata i produkata kroz kuglicu, loša mehanička otpornost, laka degradacija polimera i nemogućnost umnožavanja ćelija lociranih u središtu kuglice (Phisalaphong i sar., 2007). Usled ovih nedostataka prilikom imobilizacije kvasca u Ca-alginatu teži se formiranju čestica malih dimenzija ujednačenih u veličini (Nedović, 1999). U prisustvu fosfata, EDTA i katjona Mg^{2+} ili K^+ dolazi do rastvaranja kalcijuma što dovodi do gubitka mehaničke stabilnosti i na kraju do potpune degradacije polimera (Nikolić i sar., 2009). U cilju povećanja poroznosti, mehaničke i hemijske stabilnosti kuglica ispitana je mogućnost dodatka visoko poroznog mliva PTSK (hibrid Gold Cup) u Ca-alginat. Na ovaj način je razvijen novi nosač za imobilizaciju ćelija kvasca kombinovanjem metode adhezije ćelija na visokoporoznom mlivu PTSK i umrežavanja u kuglicama Ca-alginata. Zahvaljujući visokoj poroznosti i hidrofилности mliva PTSK omogućena je efikasna difuzija supstrata i produkata kroz polimer i povećana je mehanička otpornost kuglica. Takođe je ispitan i upoređen potencijal primene ćelija *S. cerevisiae* (DTN) imobilisanih u kuglicama Ca-alginata i novim kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK za primenu u alkoholnoj fermentaciji melase. Pored navedenog, ispitan je i uticaj dodatka mliva PTSK u Ca-alginat ili u podlogu za fermentaciju na parametre fermentacije i kvalitet dobijenog destilata. U kontrolnom eksperimentu podloge sa i bez dodataka mliva PTSK su fermentisane ekvivalentnom količinom slobodnih ćelija kvasca. Kao podloga za fermentaciju je korišćena melasa šećerne repe početne koncentracije šećera 130 g/l, obzirom na to da je prethodno u poglavlju 4.2.6. ovog rada utvrđeno da se u slučaju primene kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata pri ovoj koncentraciji šećera postiže najviša produktivnost etanola. Melasa je fermentisana u nekoliko različitih fermentacionih sistema primenom:

- slobodnih ćelija kvasca (F),
- slobodnih ćelija kvasca uz dodatak mliva PTSK u podlogu za fermentaciju (F+C),
- ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB),
- ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata uz dodatak mliva PTSK u podlogu za fermentaciju (AB+C),
- ćelija kvasca imobilisanih u novim kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).

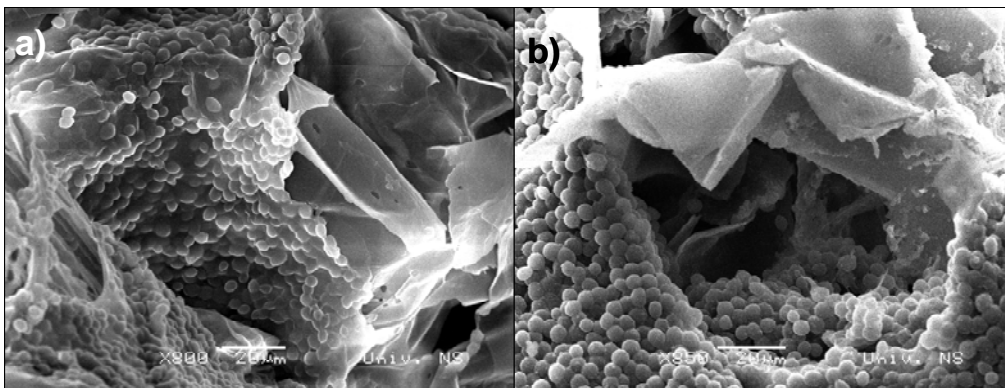
Imobilisani biokatalizator u kuglicama Ca-alginata (AB) i kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) je analiziran elektronskom mikroskopijom da bi se stekao vizuelni uvid u strukturu ispitivanih nosača i mehanizam imobilizacije kvasca. Posmatranjem slike 4.32. može se zapaziti visoka koncentracija ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata kao i gusta struktura nosača. Usled visoke koncentracije supstrata blizu površine kuglica Ca-alginata dolazi do intenzivnog rasta ćelija kvasca na površini kuglica. Gradijent koncentracije supstrata se povećava sa prečnikom odnosno veličinom kuglica Ca-alginata, pa se može dogoditi da supstrat uopšte ne dospeva do ćelija imobilisanih u središtu kuglica. Ovo za posledicu ima postepeni gubitak metaboličkih sposobnosti i na kraju odumiranje ovih ćelija kvasca (Phisalaphong i sar., 2007).

U kombinovanim ABC kuglicama imobilisane ćelije su delom adsorbovane na površini PTSK, a delom su umrežene u Ca-alginatu (Slika 4.33.). Posmatranjem strukture ABC može se zapaziti da su kombinovane ABC kuglice porozne i sačinjene od regija Ca-alginata prošaranog strukturom PTSK u čijim porama je delimično formiran tanak film Ca-alginata. Kako je ranije utvrđeno ćelijska imobilizacija na PTSK je rezultat prirodne adsorpcije usled fizičko-hemijskih i elektrostatičkih interakcija između površine ćelija kvasca i nosača, ali je takođe i rezultat zadržavanja ćelija kapilarnim silama u poroznoj strukturi. Zahvaljujući ovakvoj strukturi PTSK u kombinovanim kuglicama povećana je poroznost sloja Ca-alginata, omogućeno je umnožavanje ćelija kvasca u unutrašnjosti kombinovanih kuglica i omogućen efikasan transport supstrata i produkata kroz ABC kuglicu.

Poređenjem SEM snimaka površine kuglica sa imobilisanim ćelijama kvasca prikazanih na slici 4.32. i 4.33. može se potvrditi da su ABC kuglice značajno poroznije u poređenju sa AB kuglicama.

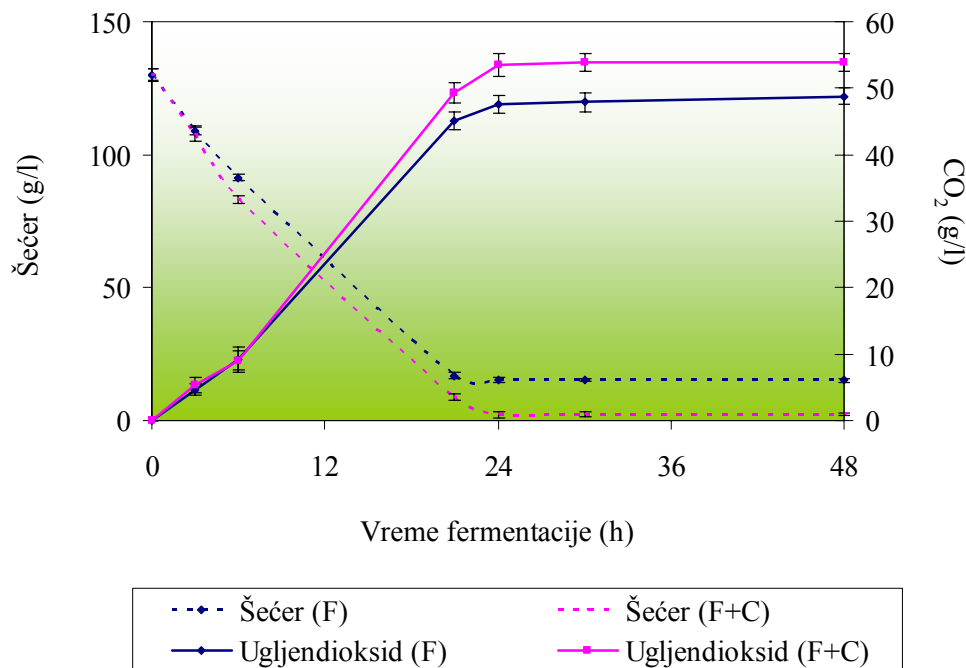


Slika 4.32. SEM snimak ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB), a) na početku i b) na kraju fermentacije melase.



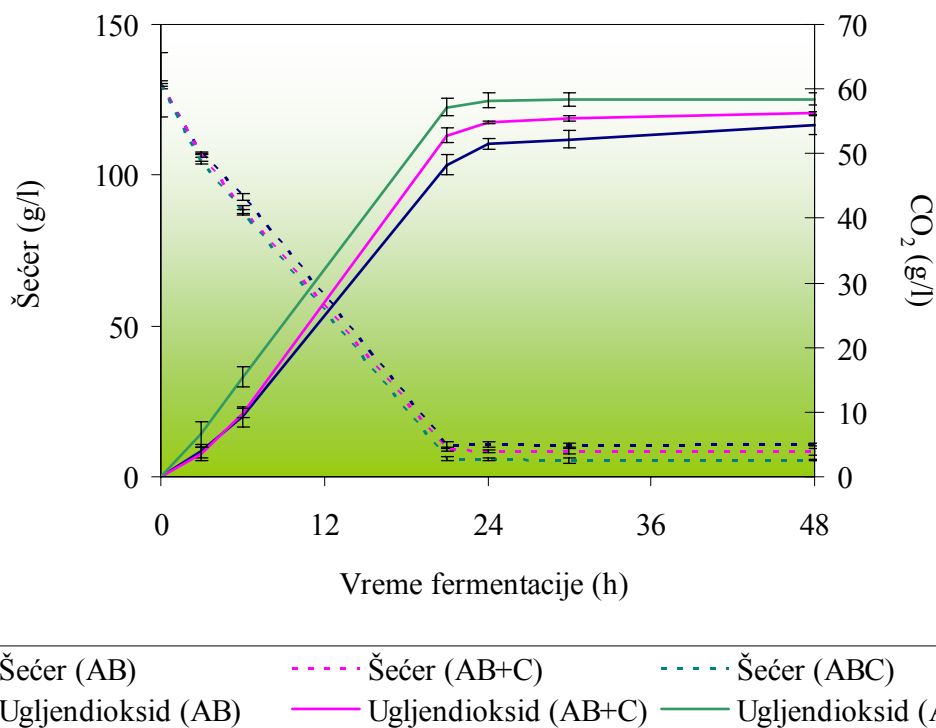
Slika 4.33. SEM snimak ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama Ca-alginata i PTSK (ABC), a) na početku i b) na kraju fermentacije melase.

Tok fermentacije u kontrolnim eksperimentima primenom slobodnih ćelija kvasca bez dodataka (F) i uz dodatak mliva PTSK (F+C) u podlogu za fermentaciju je prikazan na slici 4.34. U oba fermentaciona sistema (F i F+C) koncentracija šećera opada veoma brzo tokom fermentacije, što za posledicu ima brzo izdvajanje CO₂ i efikasnu proizvodnju etanola.



Slika 4.34. Usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom fermentacije melase, primenom slobodnih ćelija kvasca u postupku bez dodataka (F) i u postupku uz dodatak mliva PTSK u podlogu (F+C).

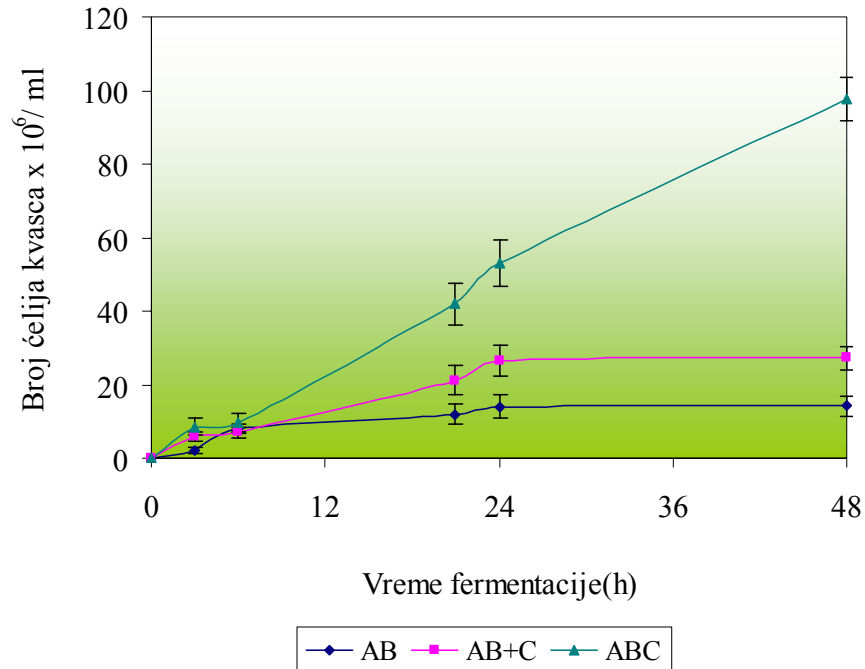
Na slici 4.35. je prikazano usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom fermentacije melase u sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca bez dodataka (AB), uz dodatak mliva PTSK u podlogu (AB+C) i uz dodatak mliva PTSK u nosač (ABC). Brzina usvajanja šećera, pa samim tim i kinetika fermentacije u sistemima sa slobodnim i imobilisanim ćelijama je bila veoma slična, te se može zaključiti da je supstrat efikasno difundovao kroz kuglice nosača. Međutim, CO₂ se izdvaja nešto brže iz sistema sa ćelijama kvasca imobilisanim na nosaču ABC u poređenju sa nosačem AB. Ovo može biti posledica veće poroznosti ABC kuglica iz kojeg se CO₂ lakše oslobađa kroz parenhimske ćelije mliva PTSK. U fizičkoj strukturi kuglica ABC na kraju fermentacije nisu uočene promene, što je od velikog značaja za primenu ovih biokatalizatora u ponovljenim diskontinualnim ili kontinualnim postupcima fermentacije.



Slika 4.35. Usvajanje šećera i izdvajanje CO₂ tokom fermentacije melase, primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata (AB), u kuglicama Ca-alginata uz dodatak mliva PTSK u podlogu za fermentaciju (AB+C) i imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).

Osnovni nedostatak primene visoko poroznog PTSK kao nosača za imobilizaciju je lako i intenzivno ispiranje ćelija kvasca imobilisanih kapilarnim silama u porama nosača. U radu je ispitan uticaj dodatka mliva PTSK u Ca-alginat ili podlogu na desorpciju i ispiranje imobilisanih ćelija kvasca sa nosača u ispitivanim fermentacionim sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca (AB, AB+C i ABC). U tom smislu, tokom fermentacije u navedenim fermentacionim sistemima (AB, AB+C i ABC) je praćena promena količine slobodnih ćelija kvasca u podlozi (Slika 4.36.). Kao što je prikazano na slici 4.36. u sva tri fermentaciona sistema koncentracija slobodnih ćelija kvasca u podlozi je postepeno rasla tokom fermentacije. Ovo se može objasniti desorpcijom ćelija kvasca i rastom desorbovanih ćelija u fermentisanoj podlozi. Nakon 24 h fermentacije primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata sa i bez dodatka PTSK u podlogu (AB i AB+C) prestaje ispiranje ćelija. Kako se prestanak ispiranja ćelija približno poklapa sa nestankom šećera u podlozi (24 h) i početkom stacionarne faze rasta ćelija, može se pretpostaviti da se u slučaju primene kuglica Ca-alginata uglavnom desorbuju i ispiraju ćelije koje su nastale umnožavanjem na samoj površini kompaktnih kuglica guste strukture. Pored toga, u AB+C fermentacionom sistemu koncentracija slobodnih ćelija kvasca je

dvostruko viša u poređenju sa AB sistemom. Ovo navodi na zaključak da je usled prisustva mliva PTSK došlo do trenja između čestica PTSK i površine kuglica Ca-alginata što je doprinelo desorpciji kvasca sa površine kuglica Ca-alginata. U sistemu sa kombinovanim nosačem ABC je desorbovana značajno viša ($p < 0,05$) količina kvasca u poređenju sa sistemima AB i AB+C, što navodi na zaključak da usled visoke poroznosti PTSK i olakšanog izdvajanja i strujanja nastalog CO_2 kroz ABC kuglicu dolazi do bržeg ispiranja ćelija imobilisanih u porama ABC kuglica.



Slika 4.36. Koncentracija slobodnih (desorbovanih) ćelija kvasca u fermentisanoj podlozi od melase, u postupcima sa imobilisanim ćelijama kvasca (AB, AB+C i ABC)

Na osnovu gore prikazanih rezultata se može zaključiti da je usled visoke poroznosti i hidrofilitnosti PTSK u kombinovanim kuglicama ABC, ostvaren bolji prenos mase supstrata i produkata kroz kuglicu, uprkos većim dimenzijama kuglica nosača. Ovo omogućava bolji rast ćelija kvasca imobilisanih u središtu kuglica, ali takođe dolazi i do intenzivnijeg ispiranja imobilisanih ćelija, nego u kuglicama AB.

Parametri fermentacije melase, početne koncentracije šećera 130 g/l, u sistemima sa slobodnim (F, F+C) i u sistemima sa imobilisanim ćelijama kvasca (AB, AB+C i ABC) su prikazani u tabeli 4.29.

Tabela 4.28. Parametri fermentacije melase (130 g/l šećera) ostvareni primenom kvasca u sistemu sa slobodnim ćelijama (F), slobodnim ćelijama uz dodatak mliva PTSK u podlogu za fermentaciju (F+C), ćelijama imobilisanim u kuglicama Ca-alginata (AB), ćelijama imobilisanim u kuglicama Ca-alginata uz dodatak PTSK u podlogu za fermentaciju (AB+C) i kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i PTSK (ABC).

Fermentacioni sistem	Stepen konverzije šećera Y_s (%)	Koncentracija etanola P (g/l)	Produktivnost etanola Q_p (g/l)	Prinos etanola na usvojeni šećer $Y_{p/s}$ (g/g)	Efikasnost fermentacije $E_{p/s}$ (%)
F	88,2	50,34 ± 1,42	1,68 ± 0,05	0,439 ± 0,001	85,9
F+C	98,3	56,18 ± 0,95	2,34 ± 0,04	0,440 ± 0,006	86,0
AB	91,8	57,12 ± 0,63	2,38 ± 0,03	0,479 ± 0,003	93,7
AB+C	93,6	58,94 ± 0,24	2,46 ± 0,01	0,484 ± 0,011	94,8
ABC	94,1	60,36 ± 0,16	2,51 ± 0,01	0,493 ± 0,001	96,6

U postupku fermentacije melase pomoću slobodnih ćelija (F) usvojeno 88,2% šećera dok je u postupku uz dodatak PTSK (F+C) usvojeno oko 98,3% šećera. U sistemu sa dodatkom PTSK za 24 h fermentacije ostvarene su više ($p < 0,05$) vrednosti koncentracije i produktivnosti etanola (56,18 g/l i 2,34 g/lh) nego u sistemu bez dodataka (50,34 g/l i 1,68 g/lh). Međutim, prinos etanola na usvojeni šećer u postupcima fermentacije sa slobodnim ćelijama (0,439 g/g) i uz dodatak PTSK (0,440 g/g) se ne razlikuju značajno ($p > 0,05$). Fermentacijom podloge od melase u sistemu F i F+C ostvareno je 85,9% i 86,0% od teorijski mogućeg prinosa. Analizirajući prikazane rezultate može se zaključiti da je dodatak PTSK u podlogu za fermentaciju pozitivno uticao na efikasnost usvajanja šećera od strane ćelija kvasca i nije imao značajnog uticaja na fermentativnu aktivnost slobodnih ćelija kvasca. Slično tome, prema rezultatima Reddy i Reddy (2005) u slučaju dodatka brašna sirka u podlogu za fermentaciju ostvaruje se bolji utrošak glukoze ali nema razlike u prinosu etanola na usvojeni šećer. Ovo je objašnjeno adsorpcijom etanola na česticama brašna sirka velike specifične površine.

Analizom ekstrakata PTSK (hybrid Gold Cup) utvrđeno je da ovaj nosač sadrži 35-37 mg/g rastvorljivih proteina i 448-644 mg/g rastvorljivih soli, koje predstavljaju hranljive materije za ćelije kvasca. Izvori azota su neophodni ćelijama kvasca kako bi mogle da sintetišu proteine i druge azotne komponente. Melasa, za razliku od skrobnih sirovina ne poseduje dovoljne količine azotnih materija, pa je pre fermentacije neophodno obogaćivanje podloge odgovarajućim izvorima azota za kvasac. Poslednja istraživanja su pokazala da obogaćivanje podloge za fermentaciju aminokiselinama u velikoj meri doprinosi toleranciji ćelija kvasca na stres, pa samim tim pozitivno utiče na rast ćelija kvasca i proizvodnju etanola (Bai i Zhao, 2012). Pored toga kvascu su tokom fermentacije neophodni mikronutricijenti kao što su vitamini i neorganski joni koji su važni regulatori i kofaktori za mnoge enzimske reakcije u intracelularnom metabolizmu (Bai i Zhao, 2012). Može se pretpostaviti da niske vrednosti rastvorljivog šećera iz PTSK (2,7 mg/g) ne mogu imati značajnog uticaja na prinos etanola. Prikazani rezultati još jednom potvrđuju da se PTSK

može koristiti kao dodatak za obogaćivanje podloge za fermentaciju hranljivim materijama, pri čemu ima pozitivan efekat na sposobnost usvajanja šećera ćelija kvasca, ali nema značajnog uticaja na fermentativnu aktivnost slobodnih ćelija kvasca.

U fermentacionim sistemima sa imobilisanim kvascem AB, AB+C i ABC usvojeno je 91,8%, 93,6% i 94,1% šećera. U ABC fermentacionom sistemu nakon 24 h fermentacije su ostvarene više vrednosti ($p < 0,05$) koncentracije i produktivnosti etanola (60,36 g/l i 2,51 g/lh) nego u sistemima AB (57,12 g/l i 2,38 g/lh) i AB+C (58,94 g/l i 2,46 g/lh). Za razliku od sistema sa slobodnim ćelijama, u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca bez dodataka (AB) je ostvarena značajno niža vrednost prinosa etanola na usvojeni šećer od 0,479 nego u postupcima sa dodatkom PTSK u podlogu (AB+C) ili nosač (ABC) od 0,484 g/g i 0,493 g/g. Ovo se može objasniti dobro poznatom činjenicom da je proizvodnja etanola usko vezana sa rastom ćelija kvasca, te da ćelije kvasca koje rastu imaju značajno bolju fermentativnu sposobnost. U slučaju odsustva usvajanja ATP-a od strane ćelija kvasca koje rastu, dolazi do akumulacije intracelularnog ATP-a koji inhibira fruktokinazu (PFK) jedan od glavnih regulacionih enzima u glikolitskom procesu, što dovodi do prekida glikolize pa samim tim i prestanka fermentacije (Bai i sar., 2008). Ćelije kvasca imobilisane u središtu kuglica Ca-alginata su fizički ograničene polimerom i stoga je njihov rast značajno otežan. Dodatak mliva PTSK u Ca-alginat omogućava ćelijama kvasca da rastu u unutrašnjosti kuglica i na zidovima parenhimskih ćelija, što doprinosi boljem glikolitskom metabolizmu, pa samim tim i značajno boljoj fermentativnoj aktivnosti ćelija kvasca. Zahvaljujući visokoj poroznosti kombinovanih kuglica omogućen je intenzivniji rast ćelija kvasca u unutrašnjosti kuglica usled čega se u ABC fermentacionom sistemu ostvaruje značajno viši prinos etanola na usvojeni šećer nego u sistemima AB i AB+C. U sistemu sa dodatkom mliva PTSK u podlogu (AB+C) utvrđena je nešto veća količina slobodnih ćelija kvasca, koje neometano rastu, u poređenju sa sistemom bez dodataka (AB). Ovo za posledicu ima viši prinos etanola na usvojeni šećer. Fermentacijom podloge od melase u sistemu AB, AB+C i ABC ostvareno je 93,7%, 94,8% i 96,6% od teorijski mogućeg prinosa, što ukazuje na veoma visoku efikasnost fermentacije pomoću imobilisanih ćelija kvasca.

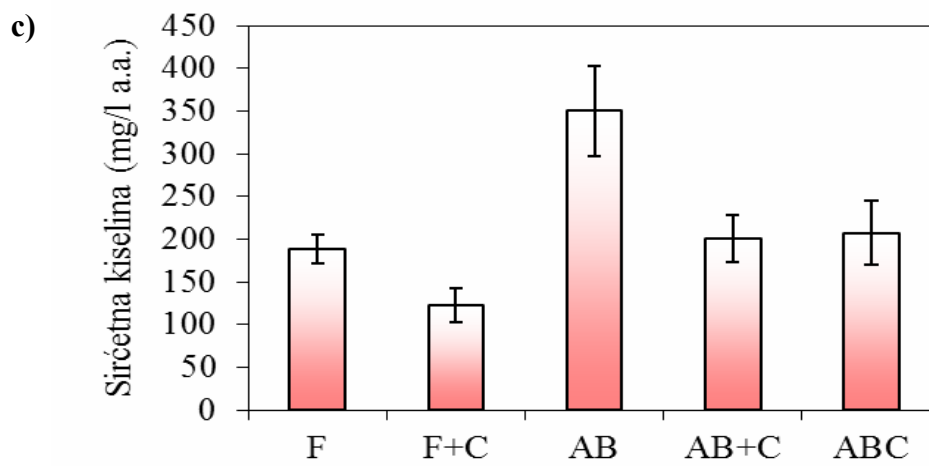
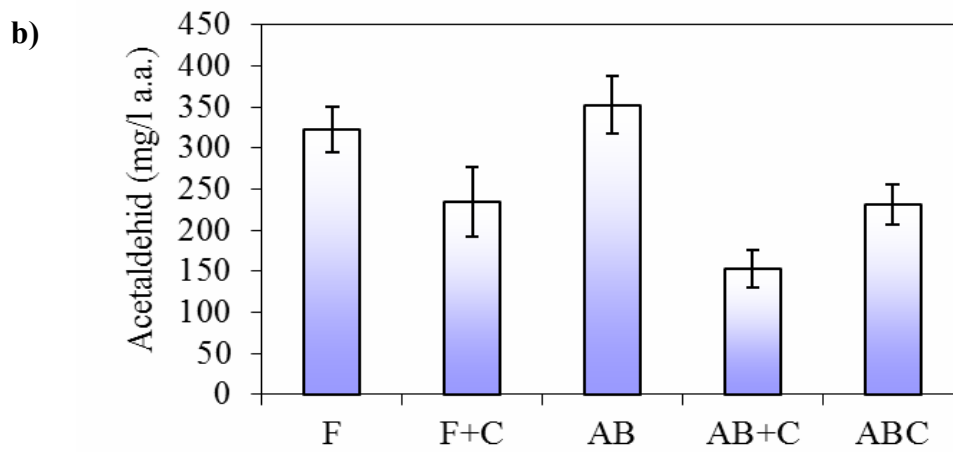
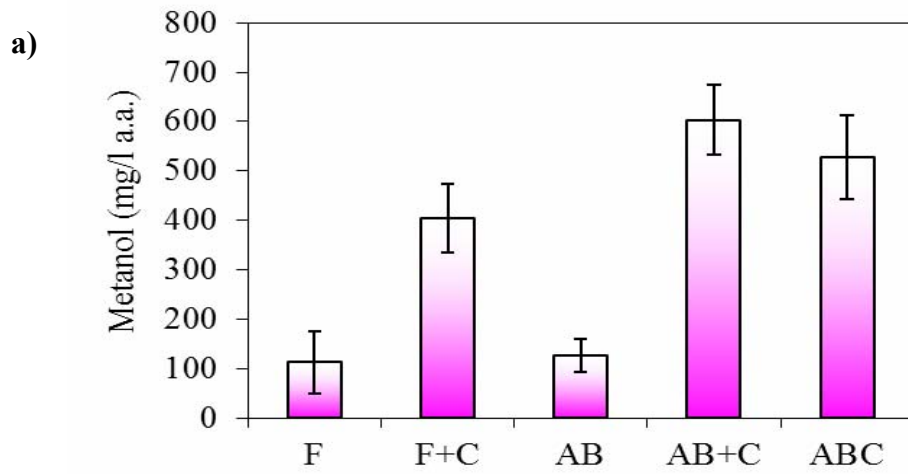
Dodatkom odgovarajuće kombinacije vitamina i minerala u podloge za fermentaciju može se postići i 20% veća efikasnost fermentacije u poređenju sa postupkom bez dodatka (Nikolić i sar., 2009). U postupcima fermentacije sa dodatkom mliva PTSK u podlogu za fermentaciju (F+C i AB+C) ostvareni su značajno viši parametri fermentacije (P , Q_p , $Y_{p/s}$, $E_{p/s}$) nego u postupcima bez dodataka (F i AB). Pozitivan uticaj dodatka mliva PTSK na parametre fermentacije može biti posledica istovremenog pozitivnog dejstva ekstrahovanih hranljivih materija iz PTSK, kao i same adsorpcije ćelija kvasca iz podloge na površinu čestica mliva.

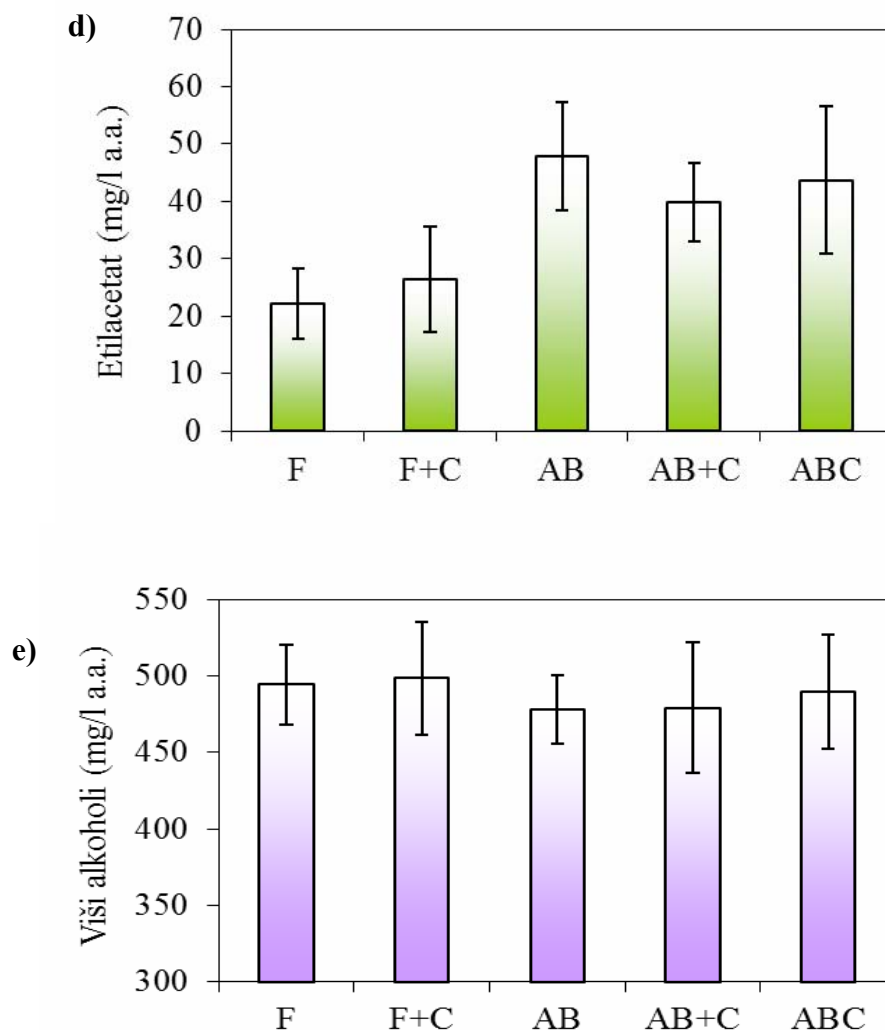
Na osnovu prikazanih rezultata se može zaključiti da dodatak PTSK u Ca-alginat ili podlogu za fermentaciju pozitivno utiče kako na sposobnost usvajanja šećera tako i na rast ćelija kvasca. Ovo za posledicu ima višu fermentativnu aktivnost kvasca i više parametre fermentacije.

Poređenjem parametara fermentacije melase (P , Q_p , $Y_{p/s}$, $E_{p/s}$) ostvarenih u sistemima sa slobodnim ćelijama (F i F+C) i imobilisanim ćelijama (AB, AB+C i ABC) može se zaključiti da su ćelije imobilisane u Ca-alginatu efikasniji biokatalizatori za fermentaciju melase od slobodnih ćelija. Ovo se može objasniti tvrdnjom da imobilisane ćelije kvasca pokazuju veću tolerantnost na toksični efekat etanola usled zaštitnog dejstva Ca-alginata (Phisalaphong i sar., 2007). Viša produktivnost etanola u sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca nego u sistemu sa slobodnim ćelijama kvasca je delimično posledica represije sinteze biomase i nusprodukata fermentacije jer se veći deo šećera usmerava direktno u proizvodnju etanola (Yue i sar., 2010). Slični rezultati su objavljeni od strane Singh i sar. (1998), koji potvrđuju da je koncentracija etanola u sistemima sa slobodnim ćelijama i ćelijama kvasca imobilisanim na Ca-alginatu relativno slična, ali su imobilisane ćelije pokazale značajne prednosti u višestepenom postupku fermentacije. Imobilisane ćelije su nakon tri ponovljena ciklusa ostale veoma aktivne i zadržale svoje metaboličke sposobnosti, čime je u procesu učinjena velika ušteda vremena i energije. Roukas (1996) je ispitivao proizvodnju etanola iz melase šećerne repe primenom ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih u Ca-alginatu u ponovljenim dolivnim postupcima fermentacije. U ponovljenim dolivnim postupcima fermentacije, imobilisane ćelije kvasca su dale višu koncentraciju etanola u poređenju sa slobodnim ćelijama i zadržale su visoku fermentativnu aktivnost tokom osam dana.

Kombinovani nosač u vidu kuglica od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) se može preporučiti kao efikasan nosač za imobilizaciju ćelija kvasca. Ovaj novi metod kombinovane imobilizacije objedinjuje prednosti dve metode imobilizacije: adsorpcije ćelija na nerastvorni nosač (PTSK) i umrežavanja kvasca u polimeru Ca-alginata. Ćelije kvasca imobilisane u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK predstavljaju dobar biokatalizator za fermentaciju melase šećerne repe, jer njihova struktura omogućuje lak transport mase supstrata i produkata. Budući da tokom fermentacije ne dolazi do degradacije kombinovanih kuglica, ovaj nosač ima značajan potencijal za primenu u dužem vremenskom periodu u višestepenim diskontinualnim ili kontinualnim postupcima. Slični rezultati su objavljeni od strane Phisalaphong i sar. (2007) u čijem radu je primenjen kombinovani nosač u vidu kuglica od biljnog sunđera i Ca-alginata.

Sa stanovišta proizvodnje etanola je važno da se obezbedi visok kvalitet etanola kao proizvoda, pa je stoga poželjno da on sadrži što manje ostalih isparljivih komponenti koje nastaju kao sporedni proizvodi fermentacije ili nastaju međusobnom reakcijom komponenti destilata. Kako bi se ispitaio uticaj dodatka PTSK u podlogu za fermentaciju ili u Ca-alginat na kvalitet dobijenih destilata analiziran je sadržaj isparljivih komponenti (metanola, aldehida, kiselina, estara, viših alkohola i furfurala) u sirovim destilatima u različitim postupcima fermentacije (F, F+C, AB, AB+C, ABC). Koncentracije isparljivih komponenti u ovim destilatima su prikazane na slici 4.37.



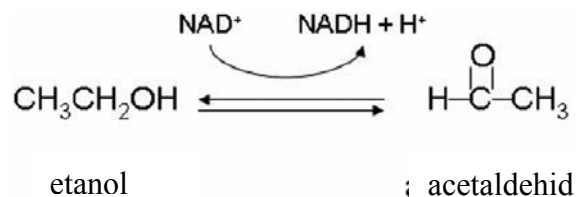


Slika 4.37. Koncentracija isparljivih komponenti: a) metanola, b) acetaldehida, c) sirćetne kiseline, d) etilacetata, e) viših alkohola u sirovim destilatima dobijenim fermentacijom melase, u različitim postupcima (F, F+C, AB, AB+C, ABC).

Metanol tokom fermentacije nastaje iz pektinskih supstanci pod dejstvom enzima pektinesteraze (Reddy i sar., 2008). Koncentracija metanola (Slika 4.37. a) u destilatima dobijenim nakon fermentacije bez dodatka PTSK je iznosila 112,30 mg/l a.a. za postupak F i 125,73 mg/l a.a. za postupak AB, dok je u postupcima uz dodatak PTSK koncentracija metanola bila višestruko viša i iznosila je 403,25 mg/l a.a. za postupak F + C, 603,52 mg/l a.a. za postupak AB + C i 528,08 mg/l a.a. za postupak ABC. Povećanje koncentracije metanola u postupcima uz dodatak PTSK je prouzrokovano prisustvom galaktoze kao osnovnog konstituenta pektina koji čini veliki deo primarnog zida parenhimskih ćelija stabla kukuruza. Akumulacija komponenti primarnog ćelijskog zida (pektinskih šećera) u parenhimskim ćelijama PTSK se odvija pre akumulacije komponenti sekundarnog ćelijskog zida (glukoze, ksiloze i lignina) po završetku elongacije internodija stabla kukuruza (Jung, 2003). Slični rezultati su objavljeni u radu Plessas i sar. (2007) gde je

primenom kvasca imobilisanih na kori pomorandže u fermentaciji melase šećerne repe dobijena relativno visoka koncentracija metanola tokom šest uzastopnih fermentacija što je objašnjeno prisustvom pektinskih materija (metilestara poligarakturonske kiseline) u kori pomorandže iz kojih tokom fermentacije nastaje metanol.

Acetaldehid je intermedijerni proizvod alkoholne fermentacije koji nastaje u glikolitskom putu iz piruvata dejstvom enzima piruvat-dekarboksilaze kao prekursor acetata i etanola (Regodón i sar., 2006). Dejstvom enzima alkohol-dehidrogenaze acetaldehid se dalje tokom fermentacije redukuje do etanola (Maconi i sar., 1988). Alkohol-dehidrogenaza (ADH) je dimerni cink metaloenzim koji katališe reverzibilnu oksidaciju alkohola u aldehide (Slika 4.38.). Tokom skladištenja destilata, etanol se može oksidovati do acetaldehida ili dalje do sirćetne kiseline dejstvom enzima alkohol-dehidrogenaze (Streitweiser i Heathcock 1976). Količina acetaldehida u svežim sirovim destilatima je pokazatelj efikasnosti glikolitskog puta, tj. konverzije acetaldehida u etanol ili aktivnosti konkurentnih metaboličkih puteva konverzije acetaldehida u acetat i dalje u acetil-koenzim A za sintezu lipida. Koncentracija acetaldehida u analiziranim destilatima (Slika 4.37. b) dobijenim u postupcima fermentacije bez dodatka PTSK je viša ($p < 0,05$) nego u postupcima uz dodatak PTSK u podlogu ili nosač. Dodatkom PTSK u podlogu za fermentaciju ili u nosač značajno se smanjuje koncentracija acetaldehida i povećava koncentracija etanola u svežem sirovom destilatu, što upućuje na zaključak da dodatak PTSK pozitivno utiče na aktivnost enzima alkohol-dehidrogenaze, koji redukuju acetaldehid do etanola. Koncentracija acetaldehida u destilatu nakon fermentacije slobodnim ćelijama bez dodatka (F, 322,38 mg/l a.a.) je bila značajno viša ($p < 0,05$) u odnosu na sistem sa dodatkom mliva PTSK (F+C, 234,92 mg/l a.a.). Analizom destilata dobijenih nakon fermentacije u sistemima sa imobilisanim ćelijama utvrđeno je da je koncentracija acetaldehida bila najviša u AB sistemu (352,47 mg/l a.a.), značajno niža u ABC sistemu (231,21 mg/l a.a.), a najniža u AB+C sistemu (152,94 mg/l a.a.). Ovi rezultati upućuju na zaključak da količina acetaldehida u destilatu zavisi od primenjenog biokatalizatora i samog fermentacionog sistema. Uticaj dodatka PTSK na koncentraciju aldehida može biti posledica dejstva ekstrahovanih i rastvorenih komponenti iz PTSK na aktivnost ključnih enzima, takođe i posledica metaboličkog stanja imobilisanih ćelija kvasca, kao i uticaja mikro-okruženja na aktivnost enzima piruvat-dekarboksilaze i alkohol-dehidrogenaze, kao osnovnih enzima u sintezi acetaldehida, u ćelijama. Takođe, uticaj dodatka PTSK može biti posledica dejstva ekstrahovanih komponenti na metabolizam aldehida kao prekursora u sintezi lipida (Mallouchos i sar., 2007). Takođe je potvrđeno da se primenom ćelija kvasca imobilisanih u Ca-alginatu i na DEAE-celulozi smanjuje količina nastalog aldehida tokom fermentacije (van Iersel i sar., 2000). Acetaldehid ima toksični efekat na ćelije kvasca usled toga što se vezuje za ćelijske proteine i inaktivira enzime, a pored toga može imati mutageno dejstvo na ćelije kvasca (Aranda i del Olmo, 2003). Analizirajući prikazane rezultate, može se pretpostaviti da će u slučaju dugotrajnog izlaganja ćelija kvasca dejstvu acetaldehida u višestepenim diskontinualnim ili kontinualnim postupcima fermentacije, dodatak PTSK u podlogu ili u Ca-alginat u određenoj meri pozitivno uticati na fiziološko stanje ćelija kvasca.



Slika 4.38. Reverzibilna oksidacija etanola u acetaldehid dejstvom enzima alkoholdehidrogenaze (Mootha i sar., 2009).

Titraciona kiselost destilata, izražena kao koncentracija sirćetne kiseline (Slika 4.37. c), je bila značajno viša za fermentacione sisteme sa imobilisanim ćelijama kvasca u poređenju sa sistemima sa slobodnim ćelijama. Slični rezultati su ranije objavljeni u radu van Iersel i sar. (2000). Pored toga, može se zapaziti da se u postupcima sa dodatkom PTSK u podlogu ili Ca-alginat dobijaju destilati sa nižom ($p < 0,05$) koncentracijom kiselina u odnosu na postupke bez dodatka PTSK. Dodatkom PTSK u podlogu za fermentaciju u sistemu sa slobodnim ćelijama kvasca titraciona kiselost u destilatu opada sa 188,9 mg/l a.a. za postupak F na 122,3 mg/l a.a. za postupak F+C. U sistemima sa imobilisanim ćelijama, najviša koncentracija sirćetne kiseline je utvrđena u postupku AB (350,4 mg/l a.a.), a značajno niža ($p < 0,05$) u postupcima AB+C (200,5 mg/l a.a.) i ABC (207,2 mg/l a.a.). Ovi rezultati su u skladu sa alkalnim karakterom PTSK hibrida Gold Cup, pa se može smatrati se dodatkom PTSK u podlogu ili Ca-alginat neutrališu kiseline u fermentacionoj podlozi pa se samim tim dobija i niža koncentracija kiselina u destilatu. Smanjenje titracione kiselosti sa dodatkom PTSK je bilo različito izraženo u pojedinim fermentacionim sistemima, što je uslovljeno različitim interakcijama metabolita slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca sa rastvorenim komponentama iz PTSK.

Estri se tokom alkoholne fermentacije formiraju iz organskih kiselina i imaju važnu ulogu u formiranju organoleptičkih karakteristika destilatata. U formiranju estara katalitičku ulogu imaju enzimi koji pripadaju grupi esteraza (Klosowski i Czupryński, 2006). Koncentracija estara izražena kao koncentracija etilacetata u destilatima za sve ispitivane fermentacione sisteme (F, F+C, AB, AB+C i ABC) je relativno niska (Slika 4.37. d). U fermentacionim sistemima sa slobodnim ćelijama kvasca koncentracija etilacetata je iznosila 22,21 mg/l a.a za sistem F i 26,40 mg/l a.a. za sistem F+C. Koncentracija etilacetata u destilatima za sisteme sa imobilisanim ćelijama je iznosila 47,87 mg/l a.a. za sistem AB, 39,89 mg/l a.a. za sistem AB+C i 43,69 mg/l a.a. za sistem ABC. U sistemima sa imobilisanim ćelijama je određena značajno viša ($p < 0,05$) koncentracija etilacetata u odnosu na sisteme sa slobodnim ćelijama, pa se može zaključiti da imobilizacija ćelija kvasca pozitivno utiče na katalitičku aktivnost esteraza. Takođe se poređenjem dobijenih rezultata može konstatovati da dodatak PTSK u podlogu za fermentaciju ili nosač za imobilizaciju nije imao uticaja na koncentraciju estara u destilatu. Pored toga, u ranijim istraživanjima je utvrđeno da promene fermentacionih uslova kao što su temperatura, količina kiseonika i azota različito utiču na različite sojeve kvasca i mogu imati nepredvidljivog uticaja na formiranje estara (Vilanova i Martinez, 2007). Razlike u ukupnoj količini proizvedenih estara kao i razlike u količini pojedinačnih estara su karakteristika specifičnosti soja kvasca i verovatno su posledica različite ekspresije gena uključenih u sinezu estara (Sumbly i sar., 2010).

Viši alkoholi nastaju iz amino kiselina Erlich-ovim mehanizmom koji podrazumeva prvo transaminaciju amino kiselina u imino kiseline, zatim sledi dezaminacija imino kiselina u keto kiseline, dekarboksilacija ovih keto kiselina u aldehide koji se na kraju redukuju u više alkohole. Pojedini viši alkoholi nemaju odgovarajuće prekursore među aminokiselinama već se formiraju direktno iz keto kiselina (Reddy i sar., 2006). Više alkohole u destilatima najčešće čini izomerna smeša primarnog metilbutanola i metilpropanola, pri čemu najveći deo čine izoamilalkohol i izobutilalkohol (Maiorella i sar., 1984). Nastanak viših alkohola tokom fermentacije u velikoj meri zavisi od sposobnosti kvasca da proizvede aminokiseline, odnosno od genskih karakteristika soja i od uslova fermentacije kao što su koncentracija etanola, temperatura fermentacije, pH (Llaurado i sar., 2005). Koncentracija viših alkohola (izoamil alkohol : izobutil alkohol = 3:1) u destilatima dobijenim u ispitanim fermentacionim sistemima (Slika 4.37. e) se međusobno ne razlikuje značajno ($p > 0,05$). Koncentracije viših alkohola u destilatima je bila u opsegu od 477,90 mg/l a.a. za sistem AB do 498,40 mg/l a.a za sistem F+C.

Furfural je aromatični aldehid koji se ne nalazi u sirovinama. Furfural nastaje u postupku destilacije dehidracijom pentoza i pentozana pri temperaturama višim od 100°C. Melasa je sirovina koja gotovo uopšte ne sadrži pentoze, pa samim tim u ispitivanim destilatima nije utvrđeno prisustvo furfurala. Međutim, PTSK sadrži polisaharid hemicelulozu koji predstavlja polimer pentoza pretežno ksiloze. Pri povišenoj temperaturi hemiceluloza se može hidrolizovati u pentoze čijom dehidracijom nastaje furfural (Yemiş i Mazza, 2011). Odsustvo furfurala u destilatima dobijenim u postupcima uz dodatak PTSK je potvrdilo da tokom fermentacije ne dolazi do ekstrakcije pentoza niti do hidrolize hemiceluloznih komponenti PTSK u pentoze, pa samim tim ni do nastanka furfurala tokom destilacije.

Na osnovu analize kvaliteta destilata može se zaključiti da se dodatkom PTSK u podlogu za fermentaciju ili u Ca-alginat kao nosač za imobilizaciju ćelija kvasca, povećava koncentracija metanola, smanjuje koncentracija acetaldehida i titraciona kiselost destilata, dok isti nema uticaja na koncentraciju etilacetata, viših alkohola i furfurala u destilatu.

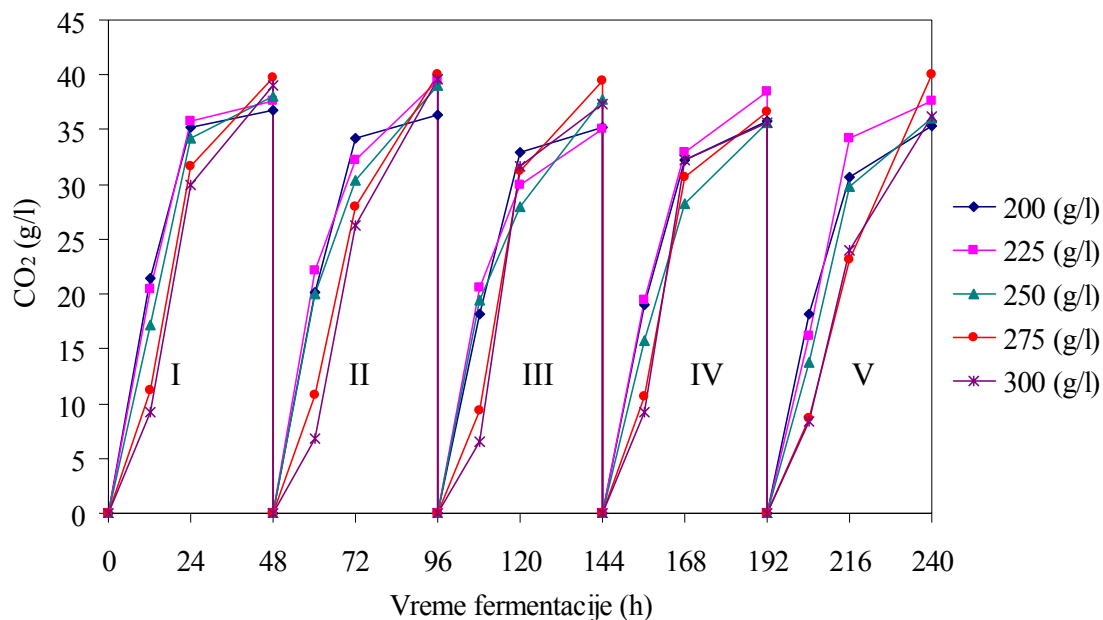
4.2.9. Višestepena diskontinualna fermentacija gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK

Alkoholna fermentacija se obično izvodi primenom ćelija kvasca u standardnim uslovima koncentracije šećera do 240 g/l (Thomas i sar., 1996). U cilju povećanja produktivnosti i ekonomičnosti proizvodnje etanola u literaturi je ispitivana VHG fermentacija u uslovima visoke koncentracije šećera, koja podrazumeva pripremu i fermentaciju podloga sa sadržajem šećera iznad 250 g/l (Bayrock i Ingledew, 2001). VHG tehnologija u industrijskoj primeni ima brojnih prednosti kao što su: povećanje koncentracije etanola, povećanje produktivnosti proizvodnje, smanjena kapitalna ulaganja, manji utrošak energije po litri etanola, smanjeni rizik od bakterijske kontaminacije i smanjena količina otpadne vode (Thomas i sar., 1996; Bai i sar., 2004).

U radu Lee i sar. (2011) je navedeno da se višestrukom upotrebom ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih u kuglicama Ca-alginata za ponovljene diskontinualne fermentacije postiže značajno brža fermentacija glukoze (10%) nego u prvom postupku fermentacije primenom sveže imobilisanog biokatalizatora. Višestrukom primenom ovog imobilisanog biokatalizatora se povećava količina ćelija kvasca u kuglicama nosača, ali tokom pet ponovljenih diskontinualnih fermentacija dolazi do narušavanja strukture i pucanja kuglica gela (Lee i sar. 2011). U poglavlju 4.2.8. je utvrđeno da imobilisane ćelije kvasca u kombinovanim kuglicama od mliva PTSK i Ca-alginata (ABC) imaju veoma visoku fermentativnu aktivnost, te da dodatak mliva PTSK u kuglice Ca-alginata doprinosi boljem transportu supstrata i produkata kroz nosač, boljoj mehaničkoj stabilnosti kuglice i u određenoj meri deluje kao zaštita ćelija i izvor hranljivih materija. Pored toga u poglavljima 4.2.4. i 4.2.6. je utvrđeno da je u VHG uslovima fermentacije gusti sok šećerne repe bolja sirovina za proizvodnju etanola od melase. Uzimajući u obzir prethodno izvedene zaključke, ispitana je mogućnost alkoholne fermentacije gustog soka šećerne repe, početne koncentracije šećera 200-300 g/l, u pet uzastopnih diskontinualnih fermentacija primenom ćelija *S. cerevisiae* DTN imobilisanih na novim kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC), sa krajnjim ciljem da se postigne što efikasniji proces proizvodnje etanola uz veću uštedu energije u procesu.

Tokom anaerobne fermentacije, nastali CO₂ koji ostaje rastvoren u podlozi negativno utiče na toleranciju i odgovor ćelija kvasca na stresne uslove sredine (Bai i Zhao, 2012). Posmatranjem dinamike izdvajanja CO₂ tokom pet ponovljenih ciklusa (I-V) diskontinualne fermentacije gustog soka (Slika 4.39.), može se zaključiti da je dodatkom mliva PTSK u kuglice od Ca-alginata omogućeno lako izdvajanje CO₂ iz kuglica polimera. Tokom prvih 12 h svake ispitivane ponovljene fermentacije, količina izdvojenog CO₂ u podlogama sa sadržajem šećera 200, 225 i 250 g/l je bila izrazito viša u poređenju sa podlogama početne koncentracije šećera 275 g/l i 300 g/l. Ovo je posledica sporijeg usvajanja šećera, usled adaptacije kvasca na stresne uslove visokog osmotskog pritiska izazvanog visokom koncentracijom šećera. Nakon što koncentracija šećera u podlozi tokom prvih 12 h fermentacije opadne, fermentacija podloga sa povišenim sadržajem šećera (275 g/l i 300 g/l) se značajno ubrzava tako da se do kraja svakog ciklusa fermentacije (48 h) količina izdvojenog CO₂ višestruko povećava. U dužem vremenskom

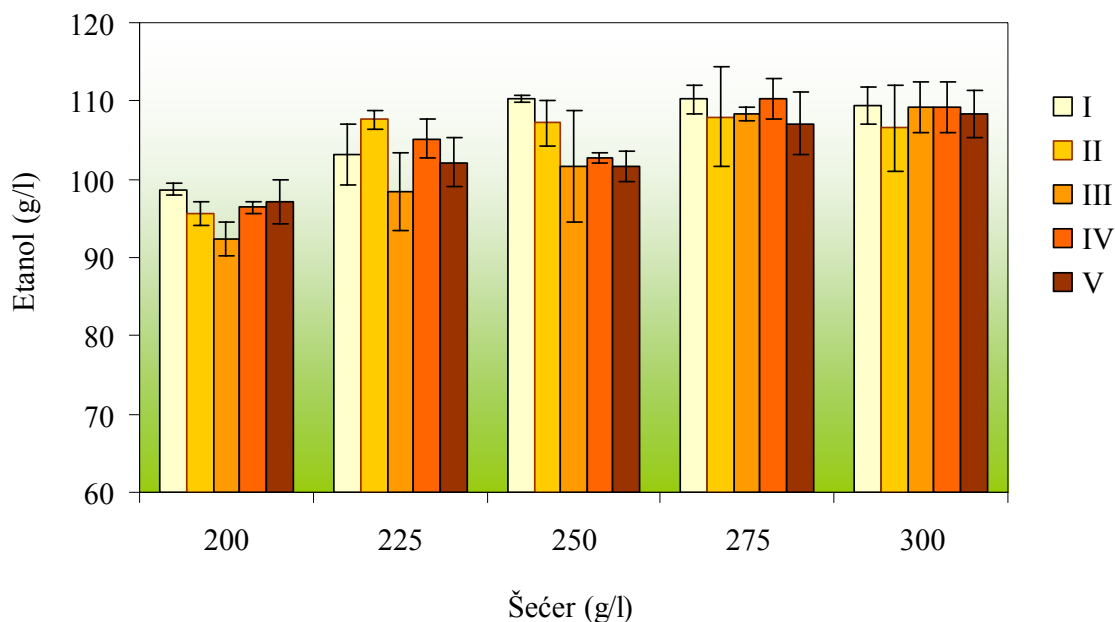
periodu (10 dana), nakon pet ponovljenih ciklusa fermentacije podloga na bazi gustog soka početne koncentracije šećera 200-300 g/l nisu uočena mehanička oštećenja niti narušavanje strukture kuglica kombinovanog nosača (ABC) usled izdvajanja CO₂, za razliku od kuglica Ca-alginata (AB). Na osnovu ovog zapažanja može se konstatovati da se kombinovani nosač može primeniti u dužem vremenskom periodu pri čemu zadržava svoja mehanička svojstva.



Slika 4.39. Izdvajanje CO₂ tokom pet ponovljenih ciklusa (I-V) fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 200-250 g/l primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).

Na osnovu koncentracije etanola ostvarene na kraju svakog ponovljenog ciklusa fermentacije (Slika 4.40.) može se zaključiti da ćelije kvasca imobilisane na kombinovanim ABC kuglicama zadržavaju podjednako dobru sposobnost proizvodnje etanola u periodu od deset dana za sve početne koncentracije gustog soka. Pri početnoj koncentraciji šećera 200 g/l, 225 g/l, 250 g/l, 275 g/l i 300 g/l u ponovljenim ciklusima fermentacije ostvarene su vrednosti koncentracije etanola 92,4-98,7 g/l, 98,4-107,6 g/l, 101,6-110,3 g/l, 107,1-110,2 g/l i 106,5-109,4 g/l. Prema dostupnim literaturnim podacima veoma visok sadržaj etanola u podlozi (20,6-23,8% v/v odnosno 162,5-187,8 g/l) može se postići VHG fermentacijom podloge od pšenice pri temperaturama fermentacije do 27°C (Jones i Ingledew, 1994; Thomas i sar., 1993, Thomas i Ingledew, 1992). U istraživanjima Pereira i sar., (2010), diskontinualnom VHG fermentacijom nusprodukata proizvodnje kukuruznog skroba ostvarena je koncentracija etanola od 147 g/l, što odgovara sadržaju od 18,6% v/v etanola uz produktivnost od 2,4 g/lh. U radovima Alfenore i sar. (2002) i Alfenore i sar. (2004) je navedeno da se primenom odgovarajuće strategije aeracije podloge (0,2 vvm) i eksponencijalnog dodatka hranljivih materija i vitamina (biotin, pantotemat, nikotinska kiselina, mezo-inozitol, tiamin, piridoksin i p-aminobenzolna kiselina) mogu postići visoke

performanse fermentacije glukoze podloge u dolivnom postupku. Na ovaj način se ostvaruje sadržaj etanola do 19% (v/v), odnosno finalna koncentracija etanola 147 g/l za 45h i produktivnost etanola do 9,5 g/lh (Alfenore i sar., 2002; Alfenore i sar., 2004). Seo i sar. (2009) navode da se VHG fermentacijom glukoze podloge u dolivnom postupku fermentacije uz primenu aeracije (0,13 mvv) može ostvariti koncentracija etanola od 160 g/l što odgovara koncentraciji etanola od 20,3 g/l pri produktivnosti od 2,0 g/lh. Pri VHG fermentaciji je od esencijalne važnosti da se redoks potencijal održi na konstantnom nivou obzirom da je ćelijama kvasca neophodna minimalna količina kiseonika kako bi se omogućila sinteza sterola i nezasićenih masnih kiselina koje predstavljaju osnovne konstituente ćelijskih membrana. Aeracijom podloge tokom VHG fermentacije (300 g/l šećera) u logaritamskoj fazi rasta se povećava broj viabilnih ćelija (2,4 puta u poređenju sa postupkom bez aeracije) što za posledicu ima efikasniju fermentaciju (Lin i sar., 2011).



Slika 4.40. Koncentracija etanola na kraju pet ponovljenih ciklusa (I-V) fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 200-250 g/l primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK.

Višestrukom primenom Ca-alginata u alkoholnoj fermentaciji dolazi do povećanja mikropora između mikrolanaca polimera. Ovo dovodi do povećanja propustljivosti i prečnika kuglica (Lee et al 2011). Nedvosmisleno je potvrđeno da ćelije *S. cerevisiae* imaju sposobnost da se adaptiraju i metabolički odgovore na stresne uslove sredine (Varela i sar., 1992). Pri tome nedostatak hranljivih materija predstavlja osnovni regulator inicijacije translacije u ćelijama *S. cerevisiae*, a nedostatak aminokiselina ili proteina inhibira fazu inicijacije translacije fosforilacionog puta (Uesono i sar., 2002). Pored navedenog, joni metala kao što su magnezijum, kalcijum i cink su neophodni kofaktori za različite

metaboličke puteve i štite *S. cerevisiae* od toksičnog dejstva etanola (Xue i sar., 2008; Birch i Walker, 2000). Budući da PTSK ima visoku moć upijanja podloge za fermentaciju može se zaključiti da se značajno povećava dostupnost hranjivih materija ćelijama imobilisanim u unutrašnjosti kuglica kao i na površini parenhimskih ćelija. Pored toga, značajno je napomenuti da je nakon svake ponovljene diskontinualne fermentacije, Erlenmeyer sud otvaran u cilju aseptičnog odlivanja i dolivanja podloge čime je dodatno omogućeno umnožavanje imobilisanih ćelija kvasca u kombinovanim ABC kuglicama, usled delimične aeracije.

U tabeli 4.29. su prikazani parametri fermentacije ostvareni nakon pet ponovljenih ciklusa fermentacije gustog soka početne koncentracije šećera 200-300 g/l primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC). Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi povećava i količina usvojenog šećera od strane imobilisanih ćelije kvasca u kuglicama ABC. Međutim, posmatrajući količinu preostalog šećera u fermentisanoj podlozi kao i stepen konverzije šećera može se zaključiti da se pri koncentracijama šećera 200 g/l usvoji gotovo sav prisutni šećer. Povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi do 300 g/l raste količina neiskorištenog šećera (S_r) i smanjuje se stepen konverzije šećera (Y_s). Nakon fermentacije gustog soka sa visokim sadržajem šećera 275 g/l i 300 g/l usvoji se 85,4-88,4% odnosno 83,0-87,7% šećera, tako da u podlozi preostane neiskorišteno 34,8-41,1 g/l odnosno 36,3-50,7 g/l šećera što predstavlja svojevrsni gubitak sa stanovišta proizvodnje etanola. Efikasnije usvajanje šećera iz podloge se može postići recirkulacijom džibre u procesu proizvodnje. Recirkulacijom izlaznog toka iz kontinualnog bioreaktora uz primenu filtracije može se postići gotovo potpuna kononverzija šećera (Branberg i sar., 2007). Pri VHG fermentaciji, šećer često nije u potpunosti iskorišćen, a deo šećera se konvertuje u glicerol koji ima važnu ulogu u regulaciji osmotskog pritiska u ćelijama kvasca (Yue i sar., 2010). Zahvaljujući ograničenom trajanju fermentacije (48 h) za sve ispitivane početne koncentracije šećera ostvarena produktivnost etanola u svih pet ciklusa je bila u opsegu od 1,92 g/lh do 2,30 g/lh. Takođe se može uočiti da povećanjem početne koncentracije šećera u podlozi raste i produktivnosti etanola. Prema literaturnim navodima visoka produktivnost etanola u višestepenoj diskontinualnoj fermentaciji je posledica uticaja oscilacije parametara sredine (koncentracije šećera i etanola) na metabolizam kvasca. Oscilatorne promene stresnih uslova tokom fermentacije (visok sadržaj šećera na početku i visok sadržaj etanola na kraju fermentacije) omogućavaju ćelijama kvasca da se periodično oporave od stresa i pripreme za sledeće stresne uslove. Ovo za posledicu ima visoku produktivnost etanola (Bai i Zhao, 2012). Ostvareni prinos etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) nije zavisio od početne koncentracije šećera u podlozi niti od broja ponovljenih ciklusa fermentacije i bio je u opsegu od 0,411 g/g do 0,499 g/g, što odgovara efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) od 80,4% do 97,6%.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se ćelije kvasca imobilisane u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK mogu dugotrajno i uspešno koristiti za višestepenu diskontinualnu alkoholnu fermentaciju gustog soka u NG i VHG uslovima. Važno je istaći da u postupcima fermentacije primenom ovako imobilisanog biokatalizatora nije došlo do izdvajanja pene iz podloge.

Tabela 4.29. Parametri fermentacije pet ponovljenih ciklusa diskontinualne fermentacije gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanih na kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).

Ciklus fermentacije	Početni šećer S_o (g/l)	Usvojeni šećer S_u (g/l)	Preostali šećer S_r (g/l)	Stepen konverzije šećera Y_s (%)	Produktivnost etanola Q_p (g/lh)	Prinos etanola na usvojeni šećer $Y_{p/s}$ (g/g)	Efikasnost fermentacije $E_{p/s}$ (%)
I	200	197,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	98,9	2,06 ± 0,02	0,499 ± 0,004	97,6
	225	215,6 ± 1,3	9,4 ± 1,3	95,6	2,15 ± 0,08	0,478 ± 0,015	93,6
	250	234,2 ± 7,7	15,8 ± 7,7	92,6	2,30 ± 0,01	0,471 ± 0,014	92,3
	275	237,7 ± 8,0	37,3 ± 8,0	85,4	2,30 ± 0,04	0,464 ± 0,023	90,8
	300	260,7 ± 2,7	39,3 ± 2,7	87,2	2,28 ± 0,05	0,420 ± 0,014	82,1
II	200	199,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	99,6	1,99 ± 0,03	0,480 ± 0,007	94,0
	225	217,4 ± 4,0	7,6 ± 4,0	96,0	2,24 ± 0,03	0,495 ± 0,015	96,9
	250	223,7 ± 2,6	26,3 ± 2,6	89,1	2,23 ± 0,06	0,479 ± 0,019	93,8
	275	234,6 ± 0,4	40,4 ± 0,4	85,2	2,25 ± 0,13	0,460 ± 0,026	90,1
	300	259,3 ± 7,7	40,7 ± 7,7	87,3	2,22 ± 0,11	0,411 ± 0,009	80,4
III	200	197,2 ± 0,6	2,8 ± 0,6	98,5	1,92 ± 0,05	0,468 ± 0,010	91,6
	225	217,5 ± 1,0	7,5 ± 1,0	96,5	2,05 ± 0,10	0,452 ± 0,021	88,5
	250	235,3 ± 6,5	14,7 ± 6,5	93,2	2,12 ± 0,15	0,433 ± 0,042	84,7
	275	233,9 ± 6,5	41,1 ± 6,5	85,9	2,26 ± 0,02	0,464 ± 0,009	90,7
	300	249,3 ± 1,1	50,7 ± 1,1	83,0	2,28 ± 0,07	0,438 ± 0,011	85,8
IV	200	199,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0	99,6	2,01 ± 0,02	0,484 ± 0,004	94,7
	225	218,4 ± 4,8	6,6 ± 4,8	96,3	2,19 ± 0,05	0,482 ± 0,000	94,3
	250	230,7 ± 0,3	19,3 ± 0,3	92,3	2,14 ± 0,01	0,446 ± 0,002	87,2
	275	235,0 ± 6,9	40,0 ± 6,9	86,3	2,30 ± 0,05	0,470 ± 0,025	92,0
	300	258,5 ± 0,6	41,5 ± 0,6	86,1	2,28 ± 0,07	0,423 ± 0,012	82,7
V	200	198,4 ± 0,4	1,6 ± 0,4	99,1	2,02 ± 0,06	0,490 ± 0,014	95,8
	225	208,1 ± 4,0	16,9 ± 4,0	91,9	2,13 ± 0,07	0,491 ± 0,006	96,1
	250	222,5 ± 3,7	27,5 ± 3,7	89,5	2,12 ± 0,04	0,457 ± 0,016	89,4
	275	240,2 ± 8,6	34,8 ± 8,6	88,4	2,23 ± 0,08	0,447 ± 0,032	87,4
	300	263,7 ± 1,2	36,3 ± 1,2	87,7	2,26 ± 0,06	0,411 ± 0,013	80,4

4.2.10. Kontinualna VHG fermentacija gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTKS

Proizvodnja etanola fermentacijom pomoću kvasca kao proizvodnog mikroorganizma je još uvek najekonomičniji i najčešće korišćeni postupak. Primenom podloga koje sadrže niske koncentracije fermentabilnih šećera ostvaruju se relativno niske koncentracije etanola. Ovo za posledicu ima velika energetska ulaganja tokom postupka destilacije. Naime, izdvaja se velika količina otpadne džibre, čija obrada višestepenim uparavanjem podrazumeva visoka energetska ulaganja, pa samim tim i poskupljuje cenu etanola kao finalnog proizvoda (Bai i sar., 2004). Proizvodnjom jedne litre etanola iz melase se u standardnim uslovima koncentracije šećera proizvede oko dvanaest litara otpadne vode koja ima veoma visoke vrednosti BOD (60,000-80,000 ppm). Obrada otpadnih voda i džibre je veoma skupa a odlaganje u životnu sredinu predstavlja ozbiljan ekološki problem (Reddy i Reddy, 2006). Usled toga se ulažu veliki napor u naučnim istraživanjima kako bi se ostvarile visoke koncentracije etanola u fermentisanim podlogama. Značajan naučni napredak je postignut u oblasti fiziologije kvasca, genetike i metaboličkog inženjeringa. Takođe je utvrđeno da mnogi nemodifikovani sojevi kvasca mogu da tolerišu daleko više koncentracije etanola nego što se ranije tvrdilo (Bai i sar., 2004). Rose (1976) ističe da se povećanjem sadržaja etanola u fermentisanoj podlozi sa 6% (v/v) na 12% (v/v) može uštedeti preko 40% energije uložene u postupku destilacije. Zahvaljujući ovome, VHG tehnologija koja podrazumeva fermentaciju podloga sa sadržajem šećera preko 250 g/l u cilju postizanja preko 15% v/v etanola je predmet brojnih naučnih istraživanja (Bayrock i Ingledew 2001; Bafrcova et al, 1999; Thomas i Ingledew 1990; Thomas i Ingledew 1992; Thomas i sar., 1993; Thomas i sar., 1996; Bai i sar., 2004).

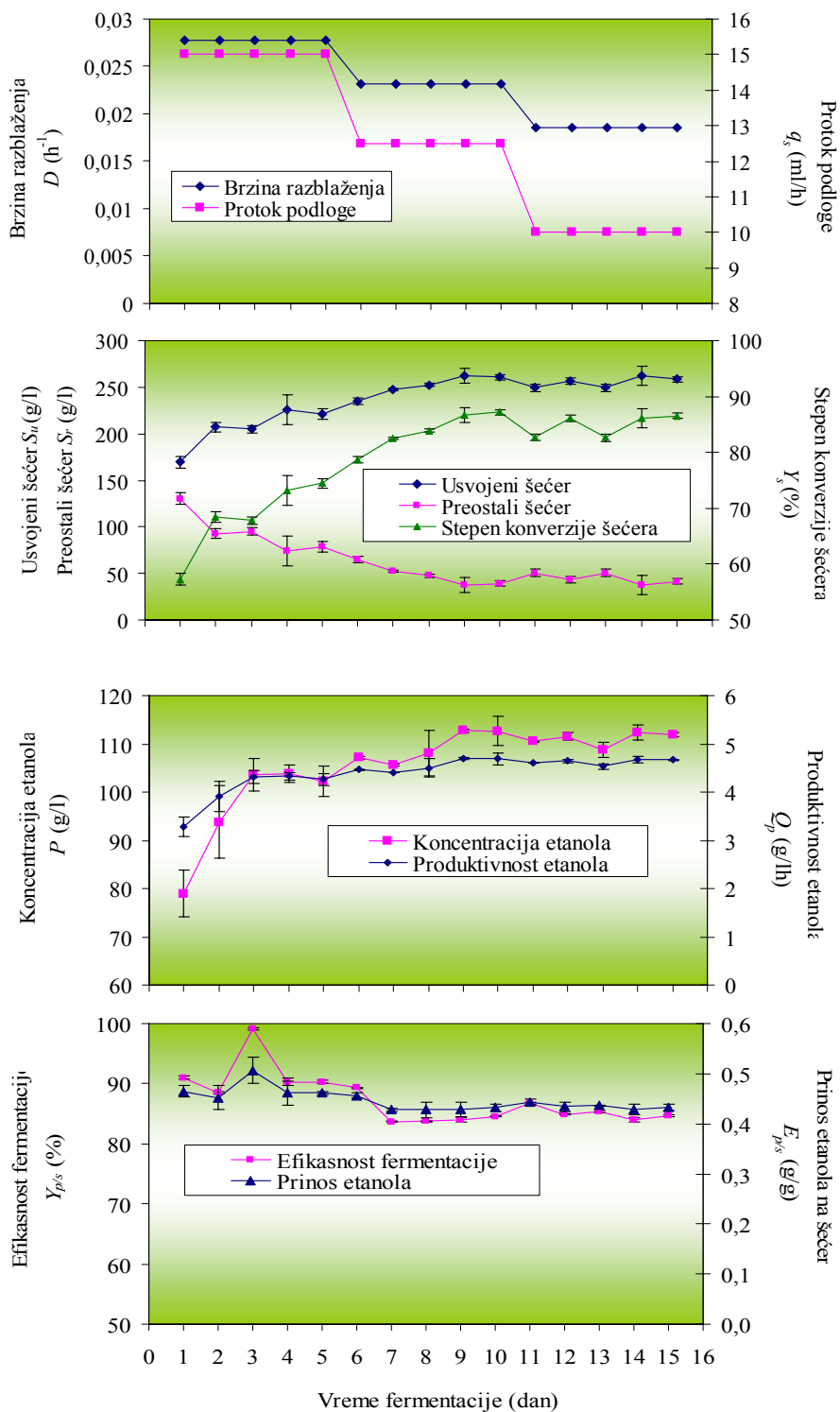
Etanol se može proizvesti u diskontinualnom, dolivnom, semikontinualnom ili kontinualnom postupku fermentacije, ali se u industriji još uvek u najvećoj meri primenjuje diskontinualni postupak (Lee i sar., 2011). Kontinualni postupak VHG fermentacije generalno ima veću produktivnost od diskontinualnog ili dolivnog postupka. Primenom imobilisanih ćelija kvasca u kontinualnom postupku fermentacije postižu se viši prinosi etanola pri većoj brzini razblaženja bez rizika ispiranja proizvodnog mikroorganizma iz sistema nego u sistemu sa slobodnim ćelijama čak i uz primenu recirkulacije (Branberg i sar., 2007). Primena slobodnih ćelija kvasca u kontinualnom procesu proizvodnje etanola podrazumeva i prisustvo velike količine ćelija u fermentisanoj podlozi, pa su neophodna visoka energetska i materijalna ulaganja za izdvajanje kvasca iz podloge postupkom centrifugiranja (Xu i sar., 2005). Pored toga u kontinualnom postupku fermentacije sa slobodnim ćelijama dolazi do taloženja ćelija kvasca na dnu bioreaktora, jer nastali CO₂ nije dovoljan da ih održi u suspenziji, pa je stoga potrebno dodatno uvoditi male količine vazduha (Bai i sar., 2004).

Primenom bioreaktora sa imobilisanim ćelijama kvasca u kontinualnom postupku fermentacije sprečava se taloženje kvasca u jednom delu reaktora i postiže homogena koncentracija inokuluma u svim delovima reaktora (Bai i sar., 2004). Produktivnost etanola ćelija *S. cerevisiae* imobilisanih na k-karagenanu u kontinualnom postupku je 11,5 puta

viša od produktivnosti slobodnih ćelija. Produktivnost etanola u kontinualnom procesu primenom kvasca imobilisanog u Ca-alginatu zavisi kako od koncentracije šećera u podlozi i protoka, tako i od količine kvasca po jedinici mase gela odnosno količine kvasca po jedinici zapremine bioreaktora. Povećanjem količine kvasca po jedinici mase gela dolazi do povećanja produktivnosti etanola. Visoke količine kvasca u gelu (50% w/v) dovode do nestabilnosti i brže degradacije kuglica polimera (Sheoran i sar., 1998). Kontinualnom fermentacijom podloga sa sadržajem šećera 50-150 g/l primenom *S. cerevisiae* imobilisanih u Ca-alginatu postiže se 10 puta veća produktivnost etanola u poređenju sa diskontinualnim postupkom (Najafpour i sar., 2004). Osnovni problemi pri primeni imobilisanih ćelija kvasca u Ca-alginatu za VHG fermentaciju su inhibicija supstratom i produktima, zadržavanje CO₂ u kuglicama gela. Ovo za posledicu ima otežani transport supstrata kroz kuglicu gela, plutanje kuglica i njihovo nakupljanje na površini supstrata u reaktoru. Dalje ovo dovodi do značajnog smanjenja produktivnosti i/ili potpunog prestanka rada bioreaktora (Lee i sar., 1983). Međutim, kontinualnom alkoholnom fermentacijom podloga sa visokim sadržajem šećera (VHG) primenom *S. cerevisiae* se može postići koncentracija etanola 162 g/l u trajanju od 20 dana (Hayashida i Otha, 1981), 159 g/l u trajanju od 8 dana (Thomas i Ingledew, 1992) i 134 g/l u višestepenom kontinualnom fermentacionom sistemu (Bayrock i Ingledew, 2001). U kontinualnom bioreaktoru se koncentracija šećera u podlozi može kontrolisati promenom protoka. Povećanjem koncentracije inokuluma može se povećati produktivnost etanola u uslovima VHG fermentacije (Thomas i sar., 1992). Konverzija šećera iz podloge se potencijalno može povećati primenom visoke koncentracije ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata i povećanjem efikasnosti transporta mase supstrata i produkata kroz kuglicu (Branberg i sar., 2007).

U prethodnom poglavlju (4.2.9.) je utvrđeno da su ćelije *S. cerevisiae* (DTN) imobilisane na kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) efikasan biokatalizator za diskontinualnu VHG fermentaciju gustog soka. Imajući u vidu sve gore navedene prednosti kontinualnih postupaka, u ovom radu je izvedena kontinualna VHG fermentacija gustog soka šećerne repe, početne koncentracije šećera 300 g/l, u bioreaktoru (staklenoj laboratorijskoj koloni) pomoću imobilisanog biokatalizatora (ABC) u trajanju od 15 dana. Prvih pet dana fermentacija je izvođena pri brzini razblaženja 0,028 h⁻¹, narednih pet dana pri brzini razblaženja 0,023 h⁻¹ i još pet dana pri brzini razblaženja 0,019 h⁻¹.

Na slici 4.41. su prikazani parametri kontinualne VHG fermentacije gustog soka šećerne repe (300 g/l šećera) primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).



Slika 4.41. Parametri kontinualne VHG fermentacije gustog soka šećerne repe, početne koncentracije šećera 300 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).

Na osnovu prikazanih rezultata može se zapaziti da se u toku prvih pet dana fermentacije pri protoku od 15 ml/h, odnosno pri brzini razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$, usvoji od 169,7 g/l šećera, u prvom danu fermentacije, do 225,4 g/l u četvrtom danu fermentacije, što odgovara stepenu konverzije šećera (Y_s) od 57,3% do 74,5%. Koncentracija etanola pri brzini razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$ je iznosila od 78,9 g/l u prvom danu fermentacije, do 103,8 g/l u četvrtom danu, što odgovara produktivnosti etanola od 3,29 g/lh do 4,33 g/lh. Relativno niska koncentracija etanola, u odnosu na očekivanu, u toku prvog i drugog dana fermentacije (78,9 g/l i 93,8 g/l) je prouzrokovana nestacionarnim stanjem u reaktoru ali može biti i posledica adaptacije ćelija kvasca na uslove visokog osmotskog pritiska u podlozi. Osmotski stres izaziva reverzibilnu inhibiciju usvajanja metionina, prolaznu inhibiciju usvajanja uracila, privremenu stimulaciju usvajanja glukoze, prolaznu represiju gena ribozomalnih proteina (RP) kao što su CYH2 i RPS27 i privremenu inhibiciju inicijacije translacije u postupku sinteze proteina (Uesono i sar., 2002). Na promenu osmotskog pritiska sredine, ćelije kvasca odgovaraju regulacijom usvajanja amino kiselina i regulacijom sinteze proteina (Varela i sar., 1992). Usled metaboličkog odgovora i adaptacije ćelija kvasca, količina usvojenog šećera i koncentracija etanola se povećavaju od prvog do trećeg dana fermentacije i postiže se koncentracija etanola od 103,6 g/l za brzinu razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$. Nakon drugog dana fermentacije, pri brzini razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$, postignuto je kvazi-stacionarno stanje obzirom da su vrednosti koncentracije etanola ostvarene od trećeg do petog dana bliske dok su istovremeno utvrđene oscilacije ostalih parametara fermentacije. Prinos etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$), pri brzini razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$ je iznosio od 0,452 g/g u drugom danu fermentacije do 0,506 g/g u četvrtom danu fermentacije, što odgovara efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) od 88,5% do 99,1%.

Nakon petog dana fermentacije protok podloge je smanjen sa 15 ml/h na 12,5 ml/h, što odgovara brzini razblaženja od $0,023 \text{ h}^{-1}$. Od petog pa do kraja desetog dana fermentacije (brzina razblaženja $0,023 \text{ h}^{-1}$) povećava se koncentracija etanola u odnosu na prvih pet dana fermentacije (brzina razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$). Pri brzini razblaženja $0,023 \text{ h}^{-1}$ količina usvojenog šećera je iznosila od 234,8 g/l u šestom danu fermentacije do 262,7 g/l šećera u devetom danu fermentacije, što odgovara stepenu konverzije šećera (Y_s) od 78,7% do 87,2%. Koncentracija etanola pri brzini razblaženja $0,023 \text{ h}^{-1}$ je iznosila od 105,7 g/l u sedmom danu do 112,4 g/l u desetom danu, što odgovara produktivnosti etanola od 4,41 g/lh do 4,70 g/lh.

Nakon 10 dana fermentacije protok podloge je smanjen sa 12,5 ml/h na 10 ml/h, što odgovara brzini razblaženja od $0,019 \text{ h}^{-1}$. Od jedanaestog do kraja petnaestog dana fermentacije (brzina razblaženja od $0,019 \text{ h}^{-1}$) usvojeno je od 249,3 g/l šećera u trinaestom danu do 361,9 g/l šećera u četrnaestom danu, što odgovara stepenu konverzije šećera (Y_s) od 82,6% do 86,5%. Koncentracija etanola pri brzini razblaženja od $0,019 \text{ h}^{-1}$ je iznosila od 108,7 g/l u trinaestom danu do 112,4 g/l u četrnaestom danu, što odgovara produktivnosti etanola od 4,53 g/lh do 4,68 g/lh.

Oscilacija parametara fermentacije je utvrđena za sve tri ispitivane brzine razblaženja, pa se može zaključiti da je u kontinualnom fermentacionom sistemu postignuto kvazi-stacionarno stanje. Fenomen kvazi-stacionarnog stanja u kontinualnim postupcima je poznat i često izučavan u literaturi. Međutim mehanizam nastanka ovog fenomena se u

slučaju kontinualne VHG fermentacije razlikuje od mehanizma za NG kontinualnu fermentaciju. Tokom VHG kontinualne fermentacije periodi oscilacije fermentacionih parametara su značajno duži nego tokom NG kontinualne fermentacije. Pri tome za razliku od NG uslova, oscilacije u količini biomase kvasca pri VHG kontinualnoj fermentaciji ne prate sinhronizovano oscilacije koncentracije preostalog šećera i etanola, usled toga što su ćelije kvasca izložene osmotskom stresu. Naime, energija oslobođena tokom fermentacije ne može odmah biti upotrebljena za biosintezu ćelija *S. cerevisiae* jer je ćelijama neophodno vreme da pripreme unutar ćelijski enzimski sistem i metabolički se prilagode stresu usled visoke koncentracije etanola (Bai i sar., 2004).

Koncentracija etanola (P), koncentracija usvojenog šećera (S_u) iz gustog soka su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim od strane Bai i sar. (2004). Naime, kontinualnom VHG fermentacijom glukozne podloge, početne koncentracije šećera 280 g/l, pri brzini razblaženja $0,027 \text{ h}^{-1}$ u bioreaktoru sa keramičkim punjenjem ostvarena je maksimalna koncentracija etanola od 112,4 g/l, dok je u fermentisanoj podlozi preostalo 43,29 g/l šećera. Takođe je primenom serije od tri kontinualna bioreaktora finalna koncentracija etanola povećana na 132 g/l (Bai i sar., 2004).

Posmatranjem promene koncentracije etanola i usvojenog šećera tokom svih petnaest dana fermentacije može se zaključiti da ovi parametri ne prate u potpunosti tok promene protoka odnosno brzine razblaženja. Smanjenjem brine razblaženja sa $0,028 \text{ h}^{-1}$ na $0,023 \text{ h}^{-1}$ povećava se koncentracija etanola i usvojenog šećera. Smanjenjem protoka se smanjuje dotok visoke količine šećera u kolonu pa su samim tim ćelije izložene nešto nižem osmotskom pritisku. Međutim, dalje smanjenje brzine razblaženja na $0,019 \text{ h}^{-1}$ ne dovodi do značajnog povećanja količine usvojenog šećera, koncentracije etanola i produktivnosti sistema.

Posmatranjem zavisnosti prinosa etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) i efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$) tokom fermentacije može se zaključiti da se tokom prvih šest dana ostvaruju više vrednosti $Y_{p/s}$ i $E_{p/s}$ nego narednih devet dana. Ovo se može objasniti pozitivnim uticajem kiseonika rastvorenog u podlozi na fermentativnu aktivnost kvasca, naime tokom prvih pet dana fermentacije protok podloge je najviši (15 ml/h) te se u kolonu doprema i najviše rastvorenog kiseonika. Smanjenjem protoka podloge u narednih deset dana (pet dana na 12,5 ml/h i još pet dana na 10 ml/h) smanjuje se količina kiseonika dostupnog ćelijama kvasca što za posledicu ima nešto niže vrednosti i stagnaciju prinosa etanola na usvojeni šećer ($Y_{p/s}$) i efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$).

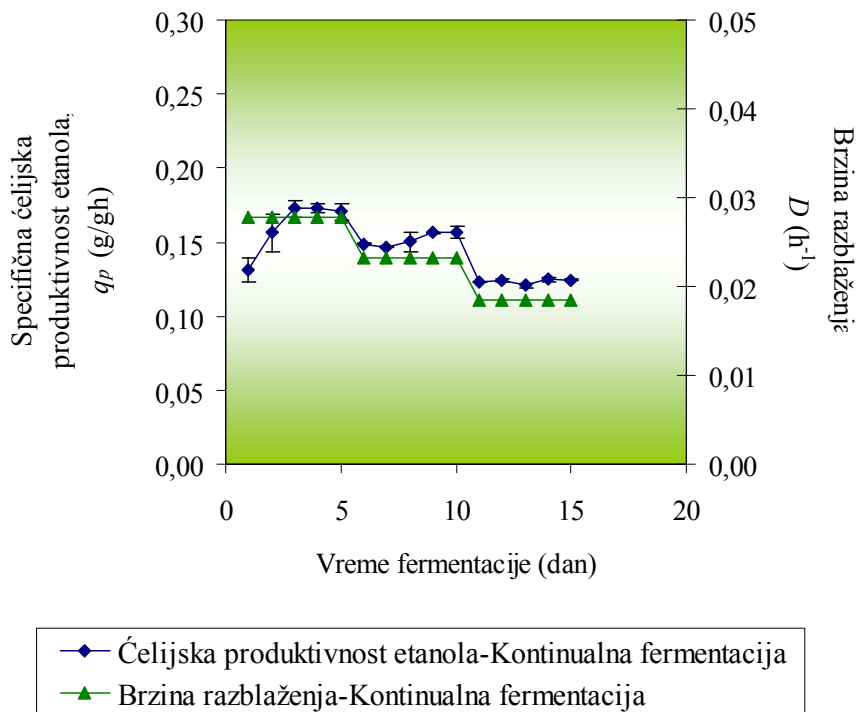
Ostvarena produktivnost etanola tokom 15 dana fermentacije se kretala od 3,29 g/lh za prvi dan fermentacije pri brzini razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$, do 4,70 g/lh za deseti dan fermentacije pri brzini razblaženja $0,023 \text{ h}^{-1}$. Poređenjem vrednosti Q_p ostvarenih VHG fermentacijom gustog soka, početne koncentracije šećera 300 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih u ABC kuglicama u kontinualnom postupku (Slika 4.41.) i višestepenom diskontinualnom postupku (Tabela 4.29.) može se zaključiti da je produktivnost etanola u kontinualnom sistemu (3,29-4,70 g/lh) izrazito viša od produktivnosti etanola u višestepenom diskontinualnom postupku (od 2,22 g/lh za prvi ciklus do 2,28 g/lh za peti ciklus fermentacije). Pri tome je veoma važno istaći da je u kontinualnom bioreaktoru, tj.

koloni, upotrebljena značajno veća količina inokuluma nego u Erlenmeyer sudu za diskontinualnu fermentaciju. Zahvaljujući većoj početnoj količini inokuluma, manje stresnim uslovima za ćelije kvasca u kontinualnom bioreaktoru u odnosu na višestepeni diskontinualni postupak ostvareno je brže i efikasnije usvajanje šećera i efikasnija proizvodnja etanola.

Prema literaturnim podacima povećanje količine inokuluma i gustine kvasca u podlozi je veoma efikasan metod za povećanje produktivnosti etanola i postizanje visokih koncentracija etanola. U radu Thomas i Ingledew (1992) primenom inokuluma od 750 miliona ćelija po gramu pšenične podloge (sa sadržajem fermentabilnih šećera 300 i 750 g/l) postižu se veoma visoke koncentracije etanola od 19,0 v/v do 21,5% v/v, pri čemu se proces može voditi bez dodatka hranljivih materija zato što u procesu 30-40% prisutnih ćelija izgubi viabilnost i lizira. Na ovaj način se oslobađa dovoljna količina hranljivih materija za kontinualno održavanje metaboličkih aktivnosti preostalih živih ćelija kvasca. Nigam (1999) je ispitivao kontinualnu fermentaciju ostataka prerade ananasa pomoću slobodnih ćelija *S. cerevisiae*. Postignuta je volumetrijska produktivnost etanola 3,75 g/lh. U radu Ghorbani i sar. (2011) u kontinualnom postupku fermentacije melase šećerne trske pomoću ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata ostvarena produktivnost etanola je bila 2,39 g/lh. Poredeći ostvarene produktivnosti etanola u kontinualnim postupcima fermentacije prikazanim u literaturi sa vrednostima ostvarenim u ovom radu može se zaključiti da je primenom imobilisanih ćelija kvasca u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) ostvena efikasna kontinualna fermentacija.

Kako bi se stekao uvid u fermentativnu aktivnost i sposobnost imobilisanih ćelija kvasca da proizvode etanol u VHG uslovima na slici 4.42. je prikazana specifična ćelijska produktivnost etanola (q_p) ostvarena tokom kontinualne fermentacije gustog soka (300 g/l šećera).

Analizirajući ostvarene vrednosti specifične ćelijske produktivnosti etanola (q_p) može se zaključiti da ako se izuzme period stabilizacije sistema (prva dva dana fermentacije), promena specifične ćelijske produktivnosti tokom fermentacije približno prati promenu brzine razblaženja. Smanjenjem brzine razblaženja smanjuje se specifična ćelijska produktivnost etanola. Na osnovu vrednosti specifične ćelijske produktivnosti (q_p) može se zaključiti da se po gramu suve mase inokuluma kvasca u toku jednog sata kontinualne fermentacije proizvede od 0,12 g, etanola pri brzini razblaženja $0,019 \text{ h}^{-1}$, do 0,17 g etanola pri brzini razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$. Specifična ćelijska produktivnost etanola u kontinualnom postupku fermentacije u određenoj meri zavisi od protoka podloge, pa se može pretpostaviti da zavisi i od dostupnosti šećera, ali i vazduha. U tom smislu se može preporučiti povremeno uvođenje male količine vazduha u kontinualni bioreaktor.



Slika 4.42. Specifična ćelijska produktivnost etanola (q_p) tokom kontinualne fermentacije gustog soka šećerne repe, početne koncentracije šećera 300 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC).

U nedavno objavljenom radu Ghorbani i sar. (2011) kontinualnom fermentacijom melase šećerne trske (koncentracije šećera 50, 100 i 150 g/l) primenom *S. cerevisiae* imobilisanih u Ca-alginatu, pri brzinama razblaženja (0,064, 0,096, 0,144 i 0,192 h^{-1}) maksimalne vrednosti koncentracije etanola (P), efikasnosti fermentacije ($E_{p/s}$), volumetrijske produktivnosti etanola (Q_p) i stepena konverzije šećera (Y_s) su iznosile 19,5 g/l, 46,23%, 2,39 g/lh i 96%. U navedenom radu je, takođe, zaključeno da se povećanjem početne koncentracije šećera u poldozi (S_o) i smanjenjem brzine razblaženja (D) povećava produktivnost etanola kontinualnog sistema.

Poređenjem parametara fermentacije ostvarenih u ovom radu sa literaturnim podacima može se zaključiti da se kontinualnom VHG fermentacijom gustog soka primenom imobilisanih ćelija kvasca ostvaruje visokoefikasan fermentacioni sistem. Analizirajući sve prikazane rezultate može se zaključiti da je primenom ćelija kvasca imobilisanih na novom kombinovanom nosaču u vidu kuglica od Ca-alginata i mliva PTSK u kontinualnom postupku VHG alkoholne fermentacije gustog soka šećerne repe postignut superioran fermentacioni sistem sa potencijalnom primenom u industrijskoj proizvodnji bioetanola.

6. ZAKLJUČAK

- Presovani rezanci šećerne repe (PRŠR), suvi rezanci šećerne repe (SRŠR) i parenhimsko tkivo stabla kukuruza (PTSK) hibrida NS 444, NS 3014, NS 5043, NS 6010, NS 6030, NS 7016 i Gold Cup su jeftini, široko rasprostranjeni, stabilni, obnovljivi, netoksični i veoma hidrofilni biomaterijali.
- Tokom sterilizacije i hidratacije u autoklavu se ne narušavanja fizička struktura PRŠR, SRŠR i PTSK. PTSK ima veći kapacitet vezivanja vode od PRŠR i SRŠR, ali je proces hidratacije PTSK značajno sporiji. Prilikom hidratacije iz jednog grama PTSK, u zavisnosti od hibrida, u vodi se ekstrahuje 24,2-44,8 mg rastvorljivih soli i 2,7-106,3 mg šećera, 3,15-5,93 mg azota, odnosno 19,69-37,19 mg proteina. Sadržaj ukupnih rastvorljivih soli, pepela i šećera u PTSK kao i kiselo-bazni karakter PTSK je karakteristika hibrida. PRŠR i SRŠR sadrže značajno manje količine rastvorljivih komponenti od PTSK. Povećanjem sadržaja etanola, dolazi do intenzivnije ekstrakcije pojedinih rastvorljivih materija iz nosača.
- PRŠR, SRŠR i PTSK imaju kako pozitivno, tako i negativno naelektrisane funkcionalne grupe, pa stoga predstavljaju efikasne adsorbente i za katjone i za anjone. Adsorpcioni afinitet PRŠR, SRŠR i PTSK prema katjonima se povećava povećanjem pH vrednosti, a prema anjonima smanjenjem pH vrednosti. Pri vrednostima pH optimalnim za fermentativnu aktivnost kvasca (5,0-5,5) PTSK ima viši kapacitet adsorpcije anjona nego PRŠR i SRŠR. PTSK je stoga efikasniji adsorbent za imobilizaciju ćelija kvasca nego SRŠR, zahvaljujući privlačnim elektrostatičkim silama između negativno naelektrisane površine ćelija kvasca i pozitivno naelektrisanih aktivnih centara nosača.
- PRŠR, SRŠR i PTSK su jeftini, perspektivni i visoko efikasni adsorbenti koji se potencijalno mogu primeniti u postupku prerade industrijskih otpadnih voda koje sadrže toksične i kancerogene katjonske i anjonske boje, a čije ispuštanje u vodotokove može izazvati ozbiljne ekološke probleme.
- Zahvaljujući visokoj poroznosti PRŠR, SRŠR i PTSK je omogućena efikasna imobilizacija i umnožavanje imobilisanih ćelija kvasca uz minimalna ograničenja internog prenosa mase supstrata i produkata kroz nosač. Ćelije kvasca se delom čvrsto adsorbuju fizičko-hemijskim interakcijama na samu površinu nosača, a delom su vezane kapilarnim silama u poroznoj strukturi nosača. U uslovima turbulentnog stujanja supstrata ćelije vezane kapilarnim silama mogu biti isprane sa nosača. Jedan deo ćelija kvasca je smešten ispod same površine nosača na izrazito pozitivno naelektrisanim i mehanički fleksibilnim segmentima nosača, koji usled elektrostatičkog afiniteta prekrivaju ćelije.

- Zahvaljujući većoj poroznosti, PTSK ima veću moć vezivanja ćelija kvasca kapilarnim silama od PRŠR i SRŠR. SRŠR imaju više vrednosti stepena adsorpcije kvasca (0,124 g/g), veću mikrobiološku stabilnost i jednostavniji su za manipulaciju u poređenju sa PRŠR, pa su stoga korišćeni kao nosač za imobilizaciju kvasca. Imobilizacioni kapacitet PTSK ne zavisi značajno od hibrida. Od ispitivanih hibrida PTSK, kao najpogodniji nosač za imobilizaciju kvasca se pokazao hibrid Gold Cup usled najvećeg stepena adsorpcije kvasca (0,131 g/g), najvećeg stepena hidratacije (28,04 g/g) i usled najmanjeg sadržaja rastvorljivih šećera (2,7 mg/g). Imobilizacija kvasca na hidratisanim SRŠR i PTSK je jeftina i jednostavna, omogućuje održavanje velike gustine ćelija kvasca. U slučaju infekcije postoji mogućnost ponovne sterilizacije i upotrebe ovih nosača.
- Primenjena melasa i gusti sok šećerne repe su veoma dobre sirovine za proizvodnu etanola usled visokog sadržaja direktno fermentabilnih šećera i jednostavne pripreme. Sa stanovišta proizvodnje etanola gusti sok je bolja sirovina u poređenju sa melasom, jer se iz jedinice mase gustog soka može proizvesti veća količina etanola nego iz jedinice mase melase, pri čemu se ostvaruje ušteda procesne vode i energije u fazi pripreme podloge, ušteda kiselina za podešavanje pH vrednosti podloge.
- PTSK se može koristiti kao alternativni obnovljivi izvor hranljivih materija neophodnih kvascu tokom fermentacije melase i gustog soka, a takođe i kao antipenušavac. Dodatkom mliva PTSK primenjenih hibrida u podloge za fermentaciju od melase i gustog soka skraćuje se vreme fermentacije i povećava prinos etanola.
- Ćelije kvasca imobilisane na hidratisanim SRŠR se mogu uspešno primeniti za sedam uzastopnih diskontinualnih fermentacija gustog soka (100 i 120 g/l šećera) bez opadanja produktivnosti procesa, dok u slučaju fermentacije melase već nakon treće fermentacije dolazi do opadanja produktivnosti etanola. Povećanjem sadržaja šećera u podlozi od melase i gustog soka sa 150 na 180 g/l dolazi do povećanja produktivnosti etanola i opadanja stepena konverzije šećera, prinosa etanola na usvojeni šećer i efikasnosti fermentacije. Maksimalna produktivnost etanola 1,48 g/lh za melasu i 1,57 g/lh za gusti sok ostvarena je pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi 180 g/l. Imobilisani biokatalizator se može uspešno primeniti za diskontinualnu fermentaciju podloga, ali nema perspektivu u višestepenoj diskontinualnoj i kontinualnoj VHG fermentaciji, usled toga što dolazi do intenzivne adsorpcije bojenih i drugih nešećernih komponenti na površinu hidratisanih SRŠR. Adsorpcija nešećernih komponenti na SRŠR dovodi do desorpcije ćelija kvasca i negativno utiče na metabolizam imobilisanih ćelija kvasca, usled čega se ostvaruju niži parametri fermentacije. Imobilizacijom kvasca se rezanaci šećerne repe obogaćuju proteinima i hranljivim materijama, pa se iskorišćeni nosač sa imobilisanim kvascem potencijalno može upotrebiti u stočnoj ishrani.
- Primenom ćelija kvasca imobilisanih na PTSK u obliku diska (visine oko 5 mm i prečnika oko 20 mm) za fermentaciju melase i gustog soka, početne koncentracije šećera 100 g/l, 150 g/l i 300 g/l, postignuta je produktivnost etanola 0,94 g/lh, 1,26 g/lh i 0,74 g/lh za melasu i 0,94 g/lh, 1,42 g/lh i 1,10 g/lh za gusti sok. Tokom VHG

fermentacije melase, ćelije kvasca su izložene stresu usled visoke koncentracije šećera i visoke koncentracije nešećernih materija. Produktivnost etanola u ovim uslovima je niža u odnosu na gusti sok. Ćelije kvasca imobilisane na PTSK se mogu uspešno primeniti za fermentaciju melase i gustog soka. Međutim, usled visokog stepena poroznosti PTSK na kraju fermentacije melase i gustog soka sa nosača se ispere više od 50% imobilisanih ćelija kvasca, što predstavlja osnovni nedostatak primene ovog nosača.

- U cilju povećanja stepena imobilizacije kvasca (R_i), efikasnosti imobilizacije kvasca (Y_i), stabilnosti nosača i sprečavanja desorpcije i ispiranja ćelija kvasca sa PTSK primenjena su dva različita postupka imobilizacije kvasca kombinovanjem prirodne adsorpcije na disku PTSK i umrežavanja u matrici Ca-alginata. Prvom metodom pripremljen je kombinovani nosač u obliku diska PTSK koji je obložen slojem Ca-alginata (K1), a drugom nosač u obliku diska PTSK koji je ispunjen Ca-alginatom (K2). Primenom nosača K1 u fermentaciji dolazi do postepenog odvajanja i pucanja tankog sloja Ca-alginata formiranog oko PTSK diska usled izdvajanja CO_2 , pa stoga ovaj nosač nije adekvatan za povećanje efikasnosti imobilizacije ćelija kvasca na PTSK. Primenom kvasca imobilisanog na i u nosaču K2 za fermentaciju gustog soka početne koncentracije šećera 150 g/l ostvarena je produktivnost etanola 1,47 g/lh. Tokom fermentacije dolazi do povećanja stepena imobilizacije što je posledica umnožavanja imobilisanih ćelija kvasca, koje u ovom slučaju u velikoj meri (72%) ostaju zadržane u strukturi nosača K2. Imobilizacijom kvasca na i u nosaču K2 je sprečeno intenzivno ispiranje ćelija kvasca sa PTSK, povećan je stepen imobilizacije kao i mehanička stabilnost nosača. Međutim, usled velike zapremine i kompaktnosti nosača K2 transport supstrata i produkata kroz disk je otežan.
- Primenom ćelija kvasca imobilisanih umrežavanjem u kuglicama Ca-alginata za fermentaciju melase i gustog soka, početne koncentracije šećera 100-300 g/l, usled izdvajanja CO_2 tokom fermentacije dolazi do narušavanja strukture kuglica pojavom poprečne pukotine koja kuglicu polimera deli na dva približno jednaka dela. Pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi iznad 200 g/l gusti sok je bolja sirovina za proizvodnju etanola od melase. U fermentacionom sistemu sa imobilisanim ćelijama kvasca u kuglicama Ca-alginata fermentacijom melase postignuta je maksimalna koncentracija etanola 86,4 g/l pri početnoj koncentraciji šećera 200 g/l. Fermentacijom gustog soka postignuta je maksimalna koncentracija etanola 109,0 g/l pri početnoj koncentraciji šećera 250 g/l. U ispitivanim fermentacionim sistemima najviša produktivnost etanola od 1,20 g/lh može se postići alkoholnom fermentacijom melase primenom ćelija kvasca imobilisanih u kuglicama Ca-alginata pri optimalnoj koncentraciji šećera u podlozi od 130 g/l.
- Melase nakon osmotske dahidracije crvenog kupusa (M1) i mrkve (M2) imaju viši sadržaj vode od polazne melase (M0), pa samim tim i niži viskozitet, čime je omogućena ušteda vode za pripremu podloge za fermentaciju, ali i energije potrebne za mešanje podloge i rastvaranje melase. Osmotskom dehidracijom crvenog kupusa i mrkve usled difuzije komponenti iz povrća u melasu i obrnuto smanjuje se sadržaj ukupnih šećera, povećava se sadržaj mineralnih materija i rastvorljivih soli,

dok se sadržaj azotnih jedinjenja ne menja značajno. Melase nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve su veoma dobre sirovine za proizvodnju etanola pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi do 150 g/l, ali nisu pogodne sirovine za fermentaciju podloga sa višim sadržajem šećera. Pojedine komponente iz crvenog kupusa i mrkve pri niskim koncentracijama šećera imaju stimulatívno dejstvo na ćelije kvasca, dok pri koncentraciji šećera u podlozi 175 g/l deluju inhibítorno na ćelije kvasca. Inhibítorno dejstvo je manje izraženo u fermentacionom sistemu sa ćelijama imobilisanim u kuglicama Ca-alginata. Najviše produktivnosti etanola za melasu M0 (1,18 g/lh), M1 (1,24 g/lh) i M2 (1,30 g/lh) ostvarene su primenom imobilisanih ćelija kvasca u kuglicama Ca-alginata za fermentaciji podloga sa početnim sadržajem šećera 125 g/l.

- U cilju povećanja poroznosti kuglica Ca-alginata (AB) razvijen je novi nosač za imobilizaciju kvasca u vidu kombinovanih kuglica od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC). U ABC kuglicama su ćelije kvasca delom adsorbovane na površini PTSK a delom su umrežene u Ca-alginatu. Usled veće poroznosti kroz ABC kuglicu je omogućen efikasniji prenos mase supstrata i produkata, u poređenju sa AB kuglicama, ali takođe dolazi do bržeg ispiranja kvasca. Fermentacijom melase početne, koncentracije 130 g/l šećera, primenom kvasca imobilisanog na kombinovanom nosaču ABC nakon 24 h fermentacije je ostvarena srednja vrednost koncentracije i produktivnosti etanola (60,36 g/l i 2,51 g/lh) Niže vrednosti su ostvarene u postupku sa primenom nosača AB (57,12 g/l i 2,38 g/lh) i u postupku sa suplementacijom PTSK u podlogu za fermentaciju AB+C (58,94 g/l i 2,46 g/lh). Imobilisane ćelije kvasca u AB i ABC kuglicama su efikasniji biokatalizatori za fermentaciju melase od slobodnih ćelija, što je posledica zaštitnog dejstva nosača na kvasac. Kombinovani nosač u vidu kuglica od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) objedinjuje prednosti adsorpcije ćelija na nerastvorni nosač (PTSK) i umrežavanja u polimeru Ca-alginata. Za razliku od AB kuglica, usled olakšanog izdvajanja CO₂, tokom fermentacije ne dolazi do narušavanja strukture ili pucanja ABC kuglica.
- Dodatkom mliva PTSK u podlogu ili u Ca-alginat povećava se sadržaj etanola i metanola, a smanjuje se sadržaj kiselina i acetaldehida u svežem sirovom destilatu. Dodatak PTSK u podlogu za fermentaciju ili nosač za imobilizaciju nije imao značajnog uticaja na sadržaj estara, viših alkohola i furfurala u destilatima.
- Imobilisane ćelije kvasca na kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) se mogu višestruko uspešno koristiti u ponovljenim diskontinualnim fermentacijama gustog soka u standardnim i VHG uslovima koncentracije šećera. Tokom pet ciklusa fermentacije ne dolazi do zadržavanja CO₂ u nosaču i narušavanja strukture nosača, kao ni do izdvajanja pene tokom fermentacije. Nakon fermentacije gustog soka sa visokim sadržajem šećera (275 g/l i 300 g/l) u ponovljenim ciklusima fermentacije u podlogama preostane 34,8-50,7 g/l šećera, što predstavlja svojevrsni gubitak sa stanovišta proizvodnje etanola. Ćelije kvasca imobilisane na kombinovanim ABC kuglicama zadržavaju podjednako dobru sposobnost proizvodnje etanola i iz gustog soka u periodu od deset dana. Pri početnoj koncentraciji šećera 200 g/l, 225 g/l, 250 g/l, 275 g/l i 300 g/l u pet ponovljenih

ciklusa fermentacije ostvarene su srednje vrednosti koncentracije etanola 92,4-98,7 g/l, 98,4-107,6 g/l, 101,6-110,3 g/l, 107,1-110,2 g/l i 106,5-109,4 g/l. Produktivnost etanola u svih pet ponovljenih ciklusa fermentacije gustog soka je bila u opsegu 1,92-2,30 g/lh.

- Kontinualna VHG fermentacija gustog soka početne koncentracije šećera 300 g/l, u bioreaktoru sa imobilisanim kvascem u kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC) je uspešno izvedena u trajanju od 15 dana. Pri brzinama razblaženja $0,028 \text{ h}^{-1}$, $0,023 \text{ h}^{-1}$ i $0,019 \text{ h}^{-1}$ usvojeno je najviše 74,46%, 87,23% i 86,54% šećera iz podloge, pri čemu su koncentracije etanola su iznosile 103,6 g/l, 112,7 g/l i 112,4 g/l. Volumetrijska produktivnost etanola je bila u opsegu 3,29-4,66 g/lh. Smanjenjem brzine razblaženja sa $0,028 \text{ h}^{-1}$ na $0,019 \text{ h}^{-1}$ smanjuje se dotok šećera i rastvorenog kiseonika u bioreaktor, pa specifična ćelijska produktivnost etanola opada sa 0,17 g/gh na 0,12 g/gh. U cilju povećanja produktivnosti etanola tokom kontinualne fermentacije može se preporučiti povremeno uvođenje male količine vazduha u bioreaktor.

7. LITERATURA

1. Aksu Z, Dönmez G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. *Chemosphere* 2003;50:1075–83.
2. Aksu Z, Isoglu AI. Use of agricultural waste sugar beet pulp for the removal of Gemazol turquoise blue-G reactive dye from aqueous solution. *J Hazard Mater* 2006;137:418-30.
3. Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, Uribelarrea JL, Goma G, Benbadis L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;60:67–72.
4. Alfenore S, Cameleyre X, Benbadis L, Bideaux C, Uribelarrea JL, Goma G, Molina-Jouve C, Guillouet SE. Aeration strategy: A need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;63:537-42.
5. Altundogan HS, Bahar N, Mujde B, Tumen F. The use of sulphuric acid-carbonization products of sugar beet pulp in Cr(VI) removal. *J Hazard Mater* 2007;144:255–64.
6. Anderson RA, Conway HF, Pfeifer VF, Griffin E. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Sci Today* 1969; 14:11–2.
7. Aranda A, del Olmo MM. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* 2003;20:747-59.
8. Aranda JS, Salgado E, Taillandier P. Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structural modeling. *Biochem Eng J* 2004;17:129-40.
9. Association of official Analytical Chemists International, 17th edition, Gaithersburg, AOAC, 2000. Official Methods: 920.53, 942.06, 966.20, 968.28, 970.57, 969.37, 977.08, 969.36, 972.08, 950.05, 962.12, 958.04, 960.16.
10. Association of official Analytical Chemists International AOAC, 1984, Gaithersburg, Official Method: 9.082
11. Bafrcnová P, Šmogrovicová D, Sláviková I, Pátkoá J, Dömény Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 1999;21:337-41.
12. Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv* 2008;26:89-105.
13. Bai FW, Chen LJ, Anderson WA, Moo-Young M. Parameter Oscillations in a Very High Gravity Medium Continuous Ethanol Fermentation and Their Attenuation on a Multistage Packed Column Bioreactor System, *Biotechnol Bioeng* 2004;88:558-66.

14. Bai FW, Ge XM, Anderson WA, Moo-Young M. Parameter oscillation attenuation and mechanism exploration for continuous VHG ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:113-21.
15. Bai FW, Zhao XQ. High gravity ethanol fermentation and yeast tolerance, in: *Microbial Stress Tolerance for Biofuels*, ed. Liu Z.L., Microbiology Monographs 22 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.
16. Bakoyianis C, Koutinas AA, Agelopoulos K, Kanellaki M. Comparative Study of Kissiris, γ -Alumina, and Calcium Alginate as Supports of Cells for Batch and Continuous Wine-Making at Low Temperatures. *J Agric Food Chem* 1997;45:4884-8.
17. Balat M, Balat H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl Energy* 2009;86:2273-82.
18. Bardi E, Bakoyianis V, Koutinas AA, Kanellaki M. Room temperature and low temperature wine making using yeast immobilized on gluten pellets. *Process Biochem* 1996;31:425-30.
19. Basha CA, Ghosh PK, Gajalakshmi G. Total dissolved solids removal by electrochemical ion exchange (EIX) process. *Electrochim Acta* 2008;54:474-83.
20. Baptista CMSG, C3ias JMA, Oliveira ACM, Oliveira NMC, Rocha JMS, Dempsey MJ, Lannigan KC, Benson PS. Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme Microb Technol* 2006;40:127-131.
21. Battacharya AK, Heinrich JG. Cellular SIC Ceramic from stems of corn-processing and microstructure, *J Mater SCI* 2006;41:2443-8.
22. Bayrock DP, Ingledew WM. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;27:87-93.
23. Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Appl Energy* 2010;87:96-100.
24. Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC. Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs. *Appl Energy* 2011;88:212-5.
25. Bekatorou A, Sarellas A, Ternan NG, Mallouchos A, Komaitis M, Koutinas AA, Kanellaki M. Low-temperature brewing using yeast immobilized on dried figs. *J Agric Food Chem* 2002;50:7249-57.
26. Beltron-Garcia MJ, Orozco JG, Smayoa AL, Ogura T. Lignin degradation of corn stalks enhance notably the radial growth of basidiomycete mushroom mycelia. *J Mex Chem Soc* 2001;45:77-81.
27. Berg Ch. World Fuel Ethanol Analysis And Outlook. 2004. The online distillery network for distilleries and fuel ethanol plants worldwide. available at: www.fo-licht.com.
28. Bhathagar A, Sillanpää M. Utilization of agroindustrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment-A review, *Chem Eng J* 2010;157:277-96.
29. Birch RM, Walker GM. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:678-87.

30. Boross L, Sisak Cs, Szajáni B. Szilárd fázisú biokatalizátorok – előállításuk, tulajdonságaik és gyakorlati alkalmazásuk, engl. Solid phase biocatalysts-production, properties and practical applications. Akadémiai Kiadó, Budapest, Magyarország, ISBN 978-963-05-8577-49-14; 2008.
31. Branberg T, Karimi K, Taherzadeh MJ, Franzén CJ, Gustafsson L. Continuous fermentation of wheat-supplemented lignocellulose hydrolysate with different types of cell retention. *Biotechnol Bioeng* 2007;98:80-90.
32. Buzás Z, Dallmann K, Szjani B. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biotechnol Bioeng* 1989;34:882-4.
33. Caputi JrA, Ueda M, Brown T. Spectrophotometric Determination of Ethanol in Wine. *Am J Enol Vitic* 1968;19:160-5.
34. Cardona CA, Sanchez OJ. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technology* 2007;98:2415–57.
35. Casey GP, Magnus CA, Ingledew WM. High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:639–46.
36. Coppola F, Bastianoni S, Østergård H. Sustainability of bioethanol production from wheat with recycled residues as evaluated by Emergy assessment. *Biomass Bioenerg* 2009;33:1626-42.
37. Chandel AK, Narasu ML, Chandrasekhar G, Mankyam A, Rao LV. Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS₃. *Bioresour Technol* 2009;100:2404-10.
38. Djelveh G, Gros JB, Emam-Djomeh Z. Osmotic Dehydration of Foods in a Multicomponent Solution, *Lebensm-Wiss u-Technol* 2001;34:319-23.
39. Dodić SN, Popov SD, Dodić JM, Ranković JA., Zavargo ZZ. Potential development of bioethanol production in Vojvodina. *Renew Sust Energ Rev* 2009;13:2722-7.
40. Dodić SN, Popov SD, Dodić JM, Ranković JA., Zavargo ZZ. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. *Biomass Bioenerg* 2009a;33:822-7.
41. Doğan M, Abak H, Alkan M. Adsorption of methylene blue onto hazelnut shell: Kinetics, mechanism and activation parameters, *J Hazard Mater* 2009;164:172-81.
42. Dombek KM, Ingram LO. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:975–81.
43. EBC. Analytica-EBC. Verlag Hans Carl Gentra'nke-Fachverlag. Grundwerk. 1998.
44. Ergun M, Mutlu FS. Application of statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 2000;73:251-5.
45. Erle U, Schubert H. Combined Osmotic and Microwave-Vacuum Dehydration of Apples and Strawberries. *J Food Eng* 2001;49:193.
46. Ertas M, Acemioğlu B, Alma MH, Usta M. Removal of methylene blue from aqueous solution using cotton stalk, cotton waste and cotton dust. *J Hazard Mater* 2010;183:421–7.

47. Farmakis L, Kapolos J, Koliadima A, Karaiskakis G. Study of the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* strains using wheat starch granules as support for yeast immobilization monitoring by sedimentation/sferic field-flow fractionation. *Food Res Int* 2007;40:717-24.
48. Filipčev B. Doktorska disertacija: Nutritivni profil, antioksidacioni potencijal i senzorski kvalitet specijalnih vrsta hlebova sa dodatkom melase šećerne repe, 2009.
49. Filipčev B, Lević Lj, Pribiš V, Kabić D. Melasa šećerne repe kao pogodan hipertonični rastvor za osmotski predtretman jabuke, XIII Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, Zbornik radova 2008;13:323-31.
50. Filipčev B, Lević Lj, Šimurina O, Kuljanin T. Priprema voća postupkom osmotske dehidracije u melasi šećerne repe sa ciljem njegove primene u pekarskoj industriji. *PTEP* 2006;10:154-7.
51. Freundlich HMF. Uber die adsorption in losungen. *Z Physik Chemie Leipzig*, 1906;57A: 385–470.
52. Foteinis S, Kouloumpis V, Tsoutsos T. Life cycle analysis for bioethanol production from sugar beet crops in Greece. *Energy Policy* 2011;39:4834-41.
53. Fujii N, Sakurai A, Onjoh K, Sakakibara M. Influence of surface characteristics of cellulose carriers on ethanol production by immobilized yeast cells. *Process Biochem* 1999;34:147-52.
54. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Esen MB, Gise S, Botstein D, Brown P. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 2000;11:4241–57.
55. Ge XM, Zhang, L, Bai FW. Impacts of temperature, pH, divalent cations, sugars and ethanol on the flocculating of SPSC01. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:783–7.
56. Genisheva Z, Mussatto SI, Oliveira JM, Teixeira JA. Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cells immobilization for ethanol production. *Ind Crops Prod* 2010;34:979-85.
57. Ghorbani F, Younese H, Sari AE, Najafpour G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *S. cerevisiae*. *Renewable Energy* 2011;36:503-9.
58. Gilson CD, Thomas A. Ethanol production by alginate immobilized yeast in a fluidized bed reactor. *J Chem Technol Biotechnol* 1995;62:38-45.
59. Guillon F, Barry JL, Thibault JF. Effect of autoclaving sugar-beet fibre on its physico-chemical properties and its in-vitro degradation by human faecal bacteria. *J Sci Food Agric* 1992;60:69–79.
60. Hansen A, Zhang Q, Lyne P. Ethanol-diesel fuel blends-a review, *Bioresour Technol* 2005;96:277-85.
61. Hatano K, Kikuchi S, Nakamura Y, Sakamoto H, Takigami M, Kojima Y. Novel strategy using an adsorbent-column chromatography for effective ethanol production from sugarcane or sugar beet molasses. *Bioresour Technol* 2009;100:4697-703.
62. Hayashida S, Ohta K. Formation of high concentrations of alcohol by various yeasts. *J Inst Brew* 1981;87:42–4.
63. Hinková A., Bubnik Z. Sugar beet as a raw material for bioethanol production. *Czech J Food Sci* 2001;18:14-22.

64. Horn SJ. Bioenergy from brown seaweeds. Doktor ingeniør Department of Biotechnology Norwegian University of Science and Technology NTNU, Trondheim, Norway 2000.
65. Iconomou D, Kandylis K, Israilides C, Nikokyris P. Protein enhancement of sugar beet pulp by fermentation and estimation of protein degradability in the rumen of sheep. *Small Ruminant Res* 1998;27:55-61.
66. Iconomou L, Psarianos C, Koutinas AA. Ethanol fermentation promoted by delignified cellulosic material. *J Ferment Bioeng* 1995;68:294-6.
67. Ingledew WM. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: A Yeast Primer: In: The alcohol textbook. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 1999.
68. Jokić A., Gyura J., Zavargo Y., Lević Lj. Kinetika konvektivnog sušenja ekstrahovanih rezanaca šećerne repe. *Hem Ind* 2005;59:73-7.
69. Jones AM, Ingledew WM. Fuel ethanol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. *Process Biochem* 1994;29:483-8.
70. Jones AM, Thomas KC, Ingledew WM. Ethanolic fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. *J Agric Food Chem* 1994;42:1242-6.
71. Jung H-JG. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochem* 2003;63:543-9.
72. Kearsley MW, Dziedzic SZ. Handbook of Starch Hydrolysis Products and Their Derivatives. Chapman Hill, London. 1995.
73. Kelsall RD, Lyons TP. Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. In: The alcohol textbook, 4th Edition, A reference for beverage, fuel and industrial alcohol industries. Ed: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall RD. Nottingham University Press 2003:121-34.
74. Klosowski G, Czupryński B. Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Eng* 2006;72:242-6.
75. Koprivica G, Mišljenović N, Lević Lj, Pribiš V. Changes in nutritive and textural quality of apple osmodehydrated in sugar beet molasses and saccharose solutions. *APTEFF* 2009;40:35-46.
76. Kopsahelis N, Agouridis N, Bekatorou A, Kanellaki M. Comparative study of spent grains and delignified spent grains as yeast supports for alcohol production from molasses. *Bioresour Technol* 2007;98:1440-7.
77. Kosaric N, Vardar-Sukan F. Potential Source of Energy and Chemical Products In: Roehr M. The Biotechnology of Ethanol, Clasical and Future Applications, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore ,Toronto, 2001:89-226.
78. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004; 21:377-97.
79. Kourkoutas Y, Kanellaki M, Koutinas AA. Apple peaces as immobilization support of various microorganisms. *LWT* 2006;39:980-6.

80. Kourkoutas Y, Komaitis M, Koutinas AA, Kaliafas A, Kanellaki M, Marchant R, Banat IM. Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. *Food Chem* 2003;82:353–60.
81. Kourkoutas Y, Komaitis M, Koutinas AA, Kanellaki M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *J Agric Food Chem* 2001;49:1417–25.
82. Krajnc D, Glavič P. Assessment of different strategies for the co-production of bioethanol and beet sugar. *Chem Eng Res Des* 2009;87:1217-31.
83. Krajnc D, Melev, Glavič P. Improving the economic and environmental performances of the beet sugar industry in Slovenia: increasing fuel efficiency and using by-products for ethanol. *J Clean Prod* 2007;15:1240-52.
84. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J Am Chem Soc* 1916;38:2221-95.
85. Laopaiboon L, Naunpeng S, Srinophakun P, Klarint P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresour Technol* 2009;100:4176–82.
86. Lazarides HN. Reasons and Possibilities to Control Solids Uptake during Osmotic Treatment of Fruits and Vegetables: Osmotic Dehydration and Vacuum Impregnation Applications in Food Industries, chapter 4, Edited by Fito P, Chiralt A, Barat JM, Spiess WEL, Behnililan D., CRC Press 2001, ISBN: 978-1-58716-043-1.
87. Lazić M., Veljković V., Banković I., Tasić M. i Povrenović D.: Tehno-Ekonomska analiza proizvodnje bioetanol U: Bioetanol kao gorivo, stanje i perspektive, Monografija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet Beograd, 2007:131-43.
88. Lee KH, Choi IS, Kim Y-G, Yang D-J, Bae H-J. Enhanced production and ultrastructural characteristics of reused *Sacchromyces cerevisiae* immobilized in Ca-alginate beads. *Bioresour Technol* 2011;102:8191-8.
89. Lee TJ, Ann JC, Ryu DDY, Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. *Enz Microb Technol* 1983;5:41-5.
90. Lević Lj, Razmovski R, Vučurović V, Koprivica G, Mišljenović N. Appliance of sugar beet molasses after osmotic dehydration of apple for bioethanol production. *PTEP* 2008;12:219-21.
91. Liang L, Zhang Y, Zhang L, Zhu M, Liang S, Huang Y. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35:1605–13.
92. Lin Y-H., Chien W-S., Duan K.J., Chang P. R. Effect of aeration timing and interval during very-high-gravity ethanol fermentation. *Process Biochem* 2011;46:1025-28.
93. Llauro JM, Rozes N, Constanti M, Mas A. Study of some *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking after preadaptation at low temperatures. *J Agric Food Chem* 2005;53:1003-11.
94. Luong J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation, *Biotechnol Bioeng* 1985;27:280–5.
95. Madden D. Immobilized Yeast Cells. In: *Microbes and Molecules*, European Initiative for Biotechnology Education, Unit 1. 1995:22-4.

96. Madson PW. Ethanol distillation: the fundamentals In: The alcohol textbook, 4th Edition A reference for beverage, fuel and industrial alcohol industries. Ed: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall RD. Nottingham University Press 2003:319-36.
97. Maiorella BL, Wilke CR, Blanch HW. Ethanol volatility in fermentation systems. Salt and metabolite effects. *Ind Eng Chem Fundam* 1984;23:332-7.
98. Maconi E, Griffini A, Cavazzoni V, Aragozzini F, Reduction of acetaldehyde to ethanol by some micro-organisms and its stereospecificity. *Biochem J* 1988;250:929-32.
99. Malbaša R, Lončar E, Djurić M, Došenović I. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chem* 2008;108:926-32.
100. Mallouchos A, Loukatos P, Bekatrou A, Koutinas A, Komatis M. Ambient and low temperature winemaking by immobilized cells on brewer's spent grains: Effect on volatile composition. *Food Chem* 2007;104:918-27.
101. Mallouchos A, Reppa P., Aggelis G., Kanellaki M., Koutinas AA, Komaitis M., Grape skins as a natural support for yeast immobilization. *Biotechnol Lett* 2002;24:1331-5.
102. Maung TA, Gustafson CR. The Economic Feasibility of Sugar Beet Biofuel Production in North Dakota presented at the Meeting of Economics of Alternative Energy Sources & Globalization: The Road Ahead, Orlando, FL, November 15-7, 2009.
103. McGee JE, Grant StJ, Detroy RW. Continuous and static fermentation of glucose to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells of different ages. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:19-22.
104. Mijović S. Alternativna goriva-Etanol i njegove smeše sa benzinom, Balkan Energy Solutions Team 2005;16:12-6.
105. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-8.
106. Mojović Lj, Pejin D., Lazić M. Bioetanol kao gorivo-Stanje i perspektive, Monografija, Tehnološki fakultet Leskovac, Univerzitet u Nišu, 2007.
107. Mootha VV, Kanoff JM, Shankardas J, Dimitrijevič S. Marked reduction of alcohol dehydrogenase in keratoconus corneal fibroblasts. *Mol Vis* 2009;15:706-12.
108. Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JA. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, *Biotechnol Adv* 2010;28:817-30.
109. Najafpour G, Younesi H, Ku ISK. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 2004;92:251-60.
110. Narendranath NV, Power R. Relationship between pH and medium dissolved solids in term of growth and metabolism of lactobacilli and *S. cerevisiae* during ethanol production. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2239-43.
111. Nedović V. Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva, Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, Srbija, 1999, ISBN 86-7244-104-4.
112. Nigam JN. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J Biotechnol* 2000;80:189-93.
113. Nikolić S, Mojović Lj, Pejin D, Rakin M, Vučurović V. Improvement of ethanol fermentation of corn semolina hydrolyzates with immobilized yeast by medium supplementation. *Food Technol Biotechnol* 2009;47:83-9.

114. Nikolić S, Mojović Lj, Rakin M, Pejin D. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel* 2009a;88:1602-7.
115. Nikolić S, Mojović Lj, Rakin M, Pejin D., Nedović V. Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*. *J Chem Technol Biotechnol* 2009b;84:497-503.
116. Norton S, Watson K, D'Amore T. Ethanol tolerance of immobilized brewer's yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;43:18-24.
117. Nuanpeng S, Laopaiboon L, Srinophakun P, Klanrit P, Jaisil P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electron J Biotechnol* 2011;14 available at: <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue1-fulltext-2>.
118. Ogbonna JC, Liu YC, Tanaka H. Loofa (*Loofa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. *J Ferment Bioeng* 1994; 78:437-42.
119. Ogbonna JC, Mashima H, Tanaka H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresour Technol* 2001;76:1-8.
120. Orzua MC, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodriguez R, de la Garza H, Teixeira JA, Aguilar CN. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Ind Crops Prod* 2009;30:24-7.
121. Öztop, H.N., Öztop, A.Y., Karada, E., Işıkver, Y., Saraydin, D., 2003. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 114-119.
122. Panagiotopoulos JA, Bakker RR, de Vrije T, Urbaniec K, Koukios EG, Claassen PAM. Prospects of utilization of sugar beet carbohydrates for biological hydrogen production in EU. *J Clean Prod* 2010;18:S9-S14.
123. Pátaková J, Šmogrovičová D, Dömény Z, Bafncová P. Very high gravity wort fermentation by immobilized yeast. *Biotechnol Lett* 2000;1173-7.
124. Pehlivan E, Yanik BH, Ahmetli G, Pehlivan M. Equilibrium isotherm studies for the uptake of cadmium and lead ions onto sugar beet pulp. *Bioresour Technol* 2008;99:3520-7.
125. Peinado RA, Moreno JJ, Villalba JM, Gonzáles-Reyes JA, Ortega JM, Mauricio JC. Yeas biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme Microb Technol* 2006;40:79-84.
126. Pejin D, Mojović LJ, Vučurović V, Pejin J, Denčić S, Rakin M. Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study, *Fuel* 2009;88;1625-8.
127. Pejin D. Tehnologija pekarskog kvasca. Tehnološki fakultet, Institut za mikrobiološke procese i primenjenu hemiju, Univerzitet Novi Sad 1989.
128. Pereira FB, Gumirães PMR, Taxieira JA, Domingues L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *S. cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour Technol* 2010;101:7856-63.
129. Petrov S. Tehnologija šećera I. Udžbenik. Tehnološki Fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 1980.
130. Phisalaphong M, Budiraharjo R, Bangrak P, Mongkolkajit J, Limtong S. Alginate-Loofa as carrier matrix for ethanol production. *J Biosci Bioeng* 2007;104:214-7.

131. Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM, Marchant R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresour Technol* 2007;98:860-5.
132. Purwadi R, Brandberg T, Taherzadeh MJ. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. *Int J Mol Sci* 2007;8:920–32.
133. Rafatullah M, Sulaiman O, Hashim R, Ahmad A. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review, *J Hazard Mater* 2010;177:70-80.
134. Ranković J. Optimizacija dobijanja etanola fermentacijom međuproizvoda tehnologije prerade šećerne repe. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet. 2011.
135. Rastogi NK, Raghavarao KS, Niranjana K, Knorr D. Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer, *Trends Food Sci Technol* 2002;13:48–59.
136. Razmovski R, Pejin D. Effect of Benomyl on *Saccharomyces cerevisiae* during continuous cultivation. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1997;44:249-56.
137. Razmovski R, Pejin D. Immobilization of *Saccharomyces diastaticus* on wood chips for ethanol production. *Folia Microbiol* 1996;41:201–7.
138. Razmovski R, Pucarević M. Effect of Brestan on *Saccharomyces cerevisiae* during continuous cultivation. *Folia Microbiol* 2002;47:507-10.
139. Razmovski R, Pucarević M. Effect of flutriafol on *Saccharomyces cerevisiae* during continuous cultivation at different dilution rate. *Roum Biotechnol Lett* 2004;9:1821-8.
140. Reddy LVA, Reddy OVS. Improvement of ethanol production in very high gravity fermentation by horse gram (*Dolichos biflorus*) flour supplementation, *Letters in Applied Microbiology* 2005;41:440-4.
141. Reddy LVA, Reddy OVS. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Role of finger millet (*Eleusine coracana* L.) flour. *Process Biochem* 2006;41:726-9.
142. Reddy LVA, Reddy YHK, Reddy OVS. Wine Production by Guava Piece Immobilized Yeast from Indian Cultivar Grapes and its Volatile Composition. *Biotechnol* 2006;5:449-54.
143. Reddy LV, Reddy YHK, Reddy LPA, Reddy OVS. Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. *Process Biochem* 2008;43:748–52.
144. Regodón MJA, Pérez-Nevado F, Fernández MR. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme Microb Technol* 2006;40:151-7.
145. Rodríguez LA, Toro ME, Vazquez F, Cerrea-Daneri ML, Gouiric SC, Vallejo MD. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:5914-7.
146. Roehr M. *The Biotechnology of Ethanol, Classical and Future Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001.

147. Rosa MD, Giroux F. Osmotic treatments and problems related to the solution management, *J Food Eng* 2001;49:223-36.
148. Rose D. Yeast for molasses alcohol, *Process Biochemistry* 1976;11:10-2.
149. Roukas T. Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *J Food Eng* 1996;27:87-96.
150. Rouilly A, Geneau-Sbartai C, Rigal L. Thermo-mechanical processing of sugar beet pulp. III. Study of extruded films improvement with various plasticizers and cross-linkers. *Bioresour. Technol.* 2009;100:3076-81.
151. Russell I. Understanding yeast fundamentals. In: *The alcohol textbook, 4th Edition A reference for beverage, fuel and industrial alcohol industries.* Ed: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall RD. Nottingham University Press 2003: 85-121.
152. Rychtera M, Basarova G, Ivanova V. Behavior and properties of released and in Calcium alginate gel immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. In: Neijssel OM, Van der Meer RR., Luvben K, ed. *Fourth congress on Biotechnology.* Netherlands: Elsevier; 1987.107-9.
153. Santos DT, Sarrouh BF, Rivaldi JD, Converti A, Silva SS. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *J Food Eng* 2008;86:542-8.
154. Seo H-B, Kim SS, Lee H-Y, Jung K-H. High-level production of ethanol during fed-batch ethanol fermentation with a controlled aeration rate and non-sterile glucose powder feeding of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2009;14:591-8.
155. Sheoran A, Yadav BS, Nigam P, Singh D. Continuous ethanol production from sugar cane molasses using a column of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1, *J Basic Microbiol* 1998;38:123-8.
156. Shen H-Y, Moonjai N, Verstrepen KJ, Delvaux FR. Impact of attachment immobilization on yeast physiology and fermentation performance. *J Am Soc Brew Chem* 2003;61:79-87.
157. Singh D, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Mchale AP. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II – Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World J Microbiol Biotechnol* 1998;14:823-34.
158. Sivakumar G, Vail DR, Xu J, Burner DM, Lay JOJr, Ge X, Weathers PJ. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *Eng Life Sci* 2010;10:8-18.
159. Streitweiser AJr, Heathcock CH. *Introduction to Organic Chemistry.* MacMillan. 1976, ISBN 0-02-418010-6.
160. Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem* 2010;121:1-16.
161. Sun R, Hughes S. Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydr Polym* 1998;36:293-9.
162. Swain RLB. Development and operation of the molecular sieve: an industry standard. In: *The alcohol textbook, 4th Edition A reference for beverage, fuel and industrial*

- alcohol industries. Ed: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall RD. Nottingham University Press 2003:337-40.
163. Šušić S, Petrov S, Kukić G, Sinobad V, Perunović P, Koronovac B, Bašić Đ. Osnovi tehnologije šećera, Univerzitet u Beogradu, 1994.
 164. Tempkin MJ, Pyzhev V. Recent modifications to Langmuir isotherms. *Acta Physiochim URSS* 1940;12:217-22.
 165. Thamae T, Marien R, Chong L, Wu C, Ballie C. Developing and characterizing new materials based on waste plastic and agro-fibre. *J Mater Sci* 2008;43:4057-68.
 166. Thomas KC, Ingledew WM. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mash. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:2046-50.
 167. Thomas KC, Ingledew WM. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *J Ind Microbiol* 1992;10:61-8.
 168. Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochem* 1996;31:321-31.
 169. Thomas KC, Hynes SH, Jones AM, Ingledew WM. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology. *Appl Biochem Biotechnol* 1993;43:211-26.
 170. Tian Y, Zhao L, Meng H, Sun L, Yan J. Estimation of un-used land potential for biofuels development in (the) People's of Republic of China. *Appl Energ* 2009;86:577-85.
 171. Tsakiris A, Bekatrou A, Psarianos C, Koutinas AA, Marchant R, Banat IM. Immobilization of yeast on dried raisin barriers for use in dry white wine-making. *Food Chem* 2004;87:11-5.
 172. Uesono Y, Toh-e A. Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J Biol Chem* 2002;277:13848-55.
 173. van Iersel MFM, Browner-Post E, Rombouts FM, Abee T. Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:602-7.
 174. Varela JC, Van Beekvelt C, Planta RJ, Mager WH. Osmotic stress-induced changes in yeast gene expression. *Mol Microbiol* 1992;6:2183-90.
 175. Vasconcelos JND, Lopes CE, Franca FPD. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Brazilian J Chem Eng* 2004;21:357-65
 176. Verbelen PJ, De Schutter DP, Delvaux F, Verstrepen KJ, Delvaux FR. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* 2006;28:1515-25.
 177. Vergnault H, Willemot R-M, Mercier-Bonin M. Non-electrostatic interactions between cultured *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and adsorbent beads in expanded bed adsorption: Influence of cell wall properties. *Process Biochem* 2007;42:244-51.
 178. Vilanova M, Martinez C. First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* CV. *Castañal* grown in Galicia (NW Spain). *Eur Food Res Technol* 2007;224:431-6.
 179. Vrbaški Lj., Markov S.: Praktikum za vežbe iz mikrobiologije, Prometej, Stručna knjiga, Novi Sad 1992;153-5.

180. Walker G. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley and sons, Chichester, England, 1998.
181. Walter A, Rosillo-Calle F, Dolzan P, Piacente E, Borges da Chuna K. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass Bioenerg* 2008;32:730-48.
182. Wang FQ, Gao CJ, Yang CY, Xu P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett* 2007;29:233-6.
183. Wiedemann B, Boles E, Keller M. Construction and optimization of pentose-fermenting yeast strains for bioethanol production. *Zuckerindustrie* 2006;131:627-31.
184. Wu X, Staggenborg S, Propheter J, Rooney W, Yu J, Wang D. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. *Ind Crops Prod* 2010;31:164-70.
185. Wyman EC. Handbook on Bioethanol, Production and Utilization, Taylor and Francis 1996.
186. Xue C, Zhao XQ, Yuan WJ, Bai FW. Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24:2257-61.
187. Xu TJ, Zhao XQ, Bai FW. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme Microb Technol* 37;2005:634-40.
188. Yemiş O, Mazza G. Acid-catalyzed conversion of xylose, xylan and straw into furfural by microwave-assisted reaction. *Bioresour Technol* 2011;102:7371-8.
189. Yu J, Zhang X, Tan T. A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *J Biotechnol* 2007;129:415-20.
190. Yue G, Jiliang Y, Zhang X, Tanwei T. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. *Biomass Bioenerg* 2010; I-5.
191. Zayed G. Production of alcohol from sugar beet molasses without heat or filter sterilization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997;19:39-42.
192. Zhaoxin L, Fengxia L, Xiaomei B, Fujimura T. Immobilization of yeast cells with polymeric carrier cross-linked using radiation technique. *J Agric Food Chem* 2002;50:2798-801.
193. Zheng Y, Yu C, Cheng Y-S, Zhang R, Jenkins B, Vander Gheynst JS. Effects of ensilage on storage and enzymatic degradability of sugar beet pulp. *Bioresour Technol* 2011;102:1489-95.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

**Redni broj:
RBR**

**Identifikacioni broj:
IBR**

**Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD**

**Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ**

**Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR**

**Autor: Mr Vesna M. Vučurović
AU**

**Mentor: Dr Radojka N. Razmovski, redovni profesor,
MN Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet Novi Sad.**

**Naslov rada: ”Alkoholna fermentacija melase i gustog soka šećerne repe
NR pomoću imobilisanih ćelija *Saccharomyces cerevisiae*”**

**Jezik publikacije: Srpski (Latinica)
JP**

**Jezik izvoda: Srpski/Engleski
JI**

**Zemlja publikovanja: Srbija
ZP**

**Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP**

**Godina: 2012.
GO**

Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar Cara Lazara 1, Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 7 Broj strana: 180 Broj literaturnih citata: 193 Broj tabela: 35 Broj slika: 68
Naučna oblast: NO	Biotehnologija
Naučna disciplina: ND	Tehnologija bioetanola
Predmetna odrednica/ključne reči: PO	Alkoholna fermentacija, etanol, melasa, gusti sok, imobilisane ćelije, kvasac
UDK:	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Vazna napomena: VN	Nema
Izvod/abstrakt: IZ	Proizvodnja bioetanola iz među- i nusproizvoda procesa prerade šećerne repe, može imati pozitivan uticaj na regionalnu ekonomiju i socio-ekonomski razvoj u zemljama sa razvijenom industrijom konzumnog šećera, kao što je Srbija. Kao proizvodni mikroorganizam u proizvodnji etanola u najvećoj meri se koristi kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Primena imobilisanih ćelija kvasca u fermentaciji podloga sa visokom sadržajem šećera (iznad 250 g/l), tzv. VHG fermentacija, je često izučavana sa ciljem povećanja efikasnosti proizvodnje etanola. U ovom radu su ćelije <i>S. cerevisiae</i> imobilisane na različitim novim nosačima: presovanim rezancima šećerne repe (PRŠR), suvim rezancima šećerne repe (SRŠR), parenhimskom tkivu stabla kukuruza (PTSK) u obliku diska, na kombinovanim nosačima od PTSK u obliku diska obloženog Ca-alginatom

(K1) i ispunjenog Ca-aglinatom (K2), na kuglicama Ca-alginata (AB) kao i na kombinovanim kuglicama od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC). Imobilisane ćelije kvasca su primenjene za fermentaciju melase i gustog soka šećerne repe sa krajnjim ciljem da se racionalnim korišćenjem među- i nusproizoda procesa prerade šećerne repe postigne efikasna proizvodnja etanola uz smanjene troškove proizvodnje kao, i uz smanjenje emisije otpadnih tokova.

U radu je ustanovljeno da su PRŠR, SRŠR i PTSK efikasni nosači za imobilizaciju ćelija kvasca zahvaljujući prisustvu pozitivno naelektrisanih funkcionalnih grupa, visokoj poroznosti, hidrofilnosti, mehaničkoj čvrstini i stabilnosti. Takođe ovi nosači štite kvasac od osmotskog stresa, toksičnog dejstva etanola i inhibitora. Zahvaljujući heterogenoj strukturi PRŠR, SRŠR i PTSK se mogu koristiti kao efikasni adsorbenti za ćelije kvasca, kao i za uklanjanje katjonskih i anjonskih komponenata u postupku prerade otpadnih voda. Pored toga, utvrđeno je da PTSK predstavlja alternativni obnovljivi izvor hranljivih materija neophodnih kvascu tokom fermentacije melase i gustog soka, a takođe deluje i kao antipenušavac. Primenom ćelija kvasca imobilisanih na SRŠR ostvarena je maksimalna produktivnost etanola od 1,48 g/lh za melasu i 1,57 g/lh za gusti sok, pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi 180 g/l. Primenom ćelija kvasca imobilisanih na PTSK u obliku diska (visine oko 5 mm i prečnika oko 20 mm) postignuta je produktivnost etanola 1,26 g/lh za melasu 1,42 g/lh za gusti sok, pri početnoj koncentraciji šećera 150 g/l. Osnovni nedostatak primene imobilisanih ćelija na SRŠR i PTSK u alkoholnoj fermentaciji je lako ispiranje ćelija sa nosača. Kombinovani nosači u obliku diska PTSK obloženog Ca-alginatom (K1) i ispunjenog Ca-aglinatom (K2) su pripremljeni kako bi se sprečilo ispiranje ćelija kvasca. Utvrđeno je da nosač K1 nije adekvatan za povećanje efikasnosti imobilizacije. Imobilizacijom kvasca punjenjem nosača K2 je povećana efikasnost imobilizacije ćelija kvasca na PTSK, ali je usled velike zapremine i kompaktnosti nosača K2 tokom fermentacije delimično otežan transport supstrata i produkata kroz disk.

Melasa i gusti sok šećerne repe su veoma dobre sirovine za proizvodnju etanola, usled visokog sadržaja fermentabilnih šećera, koji slobodne i/ili imobilisane ćelije *S. cerevisiae* mogu direktno koristiti za fermentaciju. Međutim, uzimajući u obzir hemijski sastav ovih sirovina i ostvarene parametre

fermentacije, utvrđeno je da je gusti sok bolja sirovina za proizvodnju etanola od melase, posebno u VHG uslovima. Takođe je utvrđeno da se gusti sok može koristiti kao sirovina za fermentaciju bez dodatka hranljivih materija. Ustanovljeno je da su melase koje preostaju nakon osmotske dehidracije crvenog kupusa i mrkve veoma dobre sirovine za proizvodnju etanola pri početnoj koncentraciji šećera u podlozi do 150 g/l, ali nisu pogodne sirovine za VHG fermentaciju pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija u AB kuglicama. Fermentacijom melase nakon osmotske dehidracije kupusa i mrkve početne koncentracije šećera 125 g/l, primenom ćelija kvasca imobilisanih u AB kuglicama, ostvarena je najviša produktivnost etanola od 1,24 g/lh i 1,30 g/lh. Tokom fermentacije melase i gustog soka primenom ćelija kvasca imobilisanih u AB kuglicama usled izdvajanja CO₂, dolazi do narušavanja strukture kuglica pojavom poprečne pukotine koja kuglicu polimera deli na dva približno jednaka dela.

Kako bi se sprečila degradacija Ca-alginata tokom fermentacije pripremljen je novi kombinovani nosač od Ca-alginata i mliva PTSK (ABC). Dodatkom samlevenog PTSK sa mikrostrukturom pčeljinjeg saća u Ca-alginat je povećana poroznost kuglica čime je omogućen efikasniji prenos mase supstrata i produkata, povećana je raspoloživa površina za adsorpciju i rast ćelija kvasca kao i čvrstina i stabilnost kuglica. Poređenjem parametara fermentacije, utvrđeno je da su ćelije kvasca imobilisane na ABC kuglicama efikasniji biokatalizator u poređenju sa slobodnim ćelijama kvasca, kao i u poređenju sa ćelijama imobilisanim u AB kuglicama. Dodatkom samlevenog PTSK u podlogu ili u Ca-alginat povećava se sadržaj etanola i metanola, smanjuje se sadržaj kiselina i acetaldehida u sirovom destilatu, dok se sadržaj viših alkohola, estara i furfurala ne menja značajno. Ćelije kvasca imobilisane u kombinovanim ABC kuglicama se mogu uspešno primeniti za pet ponovljenih fermentacija gustog soka pri standardnim (NG) i uslovima visoke koncentracije šećera (VHG) pri čemu se može postići produktivnost etanola 1,92-2,30 g/lh. Primenom imobilisanih ćelija kvasca u kombinovanim ABC kuglicama u kontinualnoj VHG fermentaciji gustog soka, početne koncentracije šećera 300 g/l, ostvaren je stabilan fermentacioni sistem tokom 15 dana, pri čemu je produktivnost etanola iznosila 3,29 do 4,66 g/lh.

**Datum prihvatanja teme od strane
Nastavno-Nautnog veća:** 23.09.2011.
DP

Datum odbrane: 2012.
DO

Članovi komisije:
KO

Predsednik: dr Siniša Markov, vanredni profesor,
Tehnološki fakultet Novi Sad,
Univerzitet u Novom Sadu

Mentor: dr Radojka Razmovski, redovni profesor,
Tehnološki fakultet Novi Sad,
Univerzitet u Novom Sadu

Član: dr Ljiljana Mojović, redovni profesor,
Tehnološko-Metalurški fakultet Beograd,
Univerzitet u Beogradu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD AND DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual material, printed

Contents code:

CC

Ph.D. thesis

Author:

AU

Vesna M. Vučurović, M.Sc., B.Sc.

Mentor:

MN

**Radojka N. Razmovski, Ph. D., Full professor,
Faculty of Technology, Novi Sad, University of Novi Sad**

Naslov rada:

NR

**”Alcoholic fermentation of sugar beet molasses and thick
juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells”**

Language of text:

LT

Serbian (roman)

Language of abstract:

LA

Serbian (roman)

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

Vojvodina

Publication year:

PY

2012.

Publisher: PU	Author's reprint
Publishing place: PP	Boulevard Cara Lazara 1, Novi Sad, Serbia
Physical description: FD	Chapters: 7 Pages: 180 References: 193 Tables: 35 Figures: 68
Scientific field: SF	Biotechnology
Scientific discipline: SD	Bioethanol technology
Subject/key words: SKW	Alcoholic fermentation, ethanol, molasses, thick juice, immobilized cells, yeast
UC:	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, Boulevard Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	Ph. D. Thesis=Doktorska disertacija Faculty of Technology=Tehnološki fakultet
Abstract: AB	Bioethanol production from intermediate and by-products of sugar beet processing has a beneficial scope in view of the socio-economic development and regional economy in countries with developed sugar industry, such as Serbia. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain is the most widely used ethanol producing microorganism. To increase the efficiency of ethanol production, many process improvements including immobilized cells application and fermentation of very high gravity (VHG) media with initial sugar over 250 g/l, have been studied. In the present work yeast <i>S. cerevisiae</i> was immobilized onto different new carriers: pressed sugar beet pulp (PSBP), dried sugar beet pulp (DSBP), maize stem ground tissue (MSGT) disks, MSGT discs coated with Ca-alginate (K1) and MSGT discs filled with Ca-alginate (K2), Ca-alginate beads (AB) and combined beads made

of Ca-alginate and maize stem ground tissue meal (ABC). Immobilized yeast cells were used for ethanol fermentation of molasses and thick juice with purposes to obtain efficient ethanol production, to lower high operating costs and to achieve the zero-waste goal through a rational use of by-products of sugar beet processing.

In the present work it was found that PSBP, DSBP and MSGT are efficient carriers for yeast cell immobilization due to the presence of positively charged binding sites, high porosity and hydrophilicity, good mechanical strength and stability, while functioned as a fortification against osmotic stress, toxins and inhibitors. It was also found that due to the heterogeneous structure the PSBP, DSBP and MSGT are promising adsorbents for the removal of cationic and anionic compounds from aqueous solutions in the waste water treatment. Besides, it is found that the MSGT can be used as an alternative nutrient source for yeast cells and as an anti foaming agent. A maximum ethanol productivity of 1.48 g/lh and 1.57 g/lh was achieved in the fermentation of molasses and thick juice (initial sugar of 180 g/l) using yeast immobilized on DSBP. The highest values of ethanol productivity, obtained in the case of using yeast immobilized on MSGT discs as biocatalyst, for molasses and thick juice (initial sugar of 150 g/l) fermentation were 1.26 g/lh and 1.42 g/lh. The main disadvantage of using DSBP and MSGT supported biocatalyst is intensive leakage of yeast cells during the fermentation. In order to prevent yeast leakage combined carriers in the form of MSGT discs coated with Ca-alginate (K1) and MSGT discs filled with Ca-alginate (K2) were prepared. The K1 carrier was found to be unsuccessful for improving yeast immobilization efficiency, while the application K2 carrier improved yeast immobilization efficiency during the fermentation. However, due to the large volume and compactness of the K2 carrier substrate and product mass transfer limitation were observed during the fermentation.

The sugar beet molasses and thick juice are very good raw materials for ethanol production due to high content of fermentable sugars, which can be directly used for fermentation by free and/or immobilized *S. cerevisiae* cells without any modification. However, taking into

consideration quality of these raw materials and obtained fermentation parameters, sugar beet thick juice was found to be more suitable raw material for ethanol fermentation, compared to molasses, particularly in the VHG fermentation process and can be used without any nutrient supplementation. Similarly, it was found that molasses left after the osmotic dehydration of red cabbage (M1) and carrots (M2) are excellent raw materials for ethanol fermentation of media with initial sugar concentration up to 150 g/l, while they are not convenient for VHG fermentation by free or immobilized yeast cells in AB carrier. Maximum ethanol productivity obtained at the end of fermentation of molasses M1 and M2 by immobilized yeast in AB carrier was 1.24 g/lh and 1.30 g/lh, respectively. The release of CO₂ during the fermentation of molasses and thick juice by yeast cells immobilized in the AB, lead to breakage of polymer beads on two halves.

In order to prevent AB disruption, a new combined yeast carrier (ABC) was developed by the addition of MSGT meal into the Ca-alginate. It was found that the addition of MSGT meal, with honeycomb microstructure, provided large surface area for yeast cell attachment and biofilm growth, and also increased alginate matrix porosity, enabling better mass transfer characteristic, better physical strength and stability of beads. The highest values of fermentation parameters were obtained in the fermentation system with yeast immobilized on ABC carrier in comparison with free yeast cells and yeast immobilized on AB carrier. The Ca-alginate and medium supplementation with MSGT meal significantly increased ethanol and methanol content, decreased acetaldehyde and acetic acid content of the distillate, but did not affect fusel alcohol, ester and furfural content of the distillate. Repeated batch normal gravity (NG) and very high gravity (VHG) ethanol fermentation of thick juice by yeast immobilized on ABC carrier was successfully carried out for at least five successive cycles without any significant decrease in ethanol productivity which was in the range 1.92-2.30 g/lh. Continuous VHG ethanol fermentation of thick juice (initial sugar of 300 g/l) using yeast immobilized on ABC was stable for at least 15 days while achieved ethanol productivity was 3.29-4.66 g/lh.

Accepted by the Scientific Board on: 23.09.2011.
ASB

Defended on: 2012.
DE

Thesis defend board:
(Names/Surname/Degree/Title/Faculty)
DB

President: Siniša Markov, Ph. D.,
Associate professor,
Faculty of Technology Novi Sad,
University of Novi Sad.

Mentor: Radojka Razmovski, Ph. D.,
Full professor,
Faculty of Technology Novi Sad,
University of Novi Sad.

Member: Ljiljana Mojović, Ph. D.,
Full professor,
Faculty of Technology and Metallurgy Belgrade,
University of Belgrade.