



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ



Јована Граховац, дипл. инж-мастер

**ОПТИМИЗАЦИЈА ДОБИЈАЊА ЕТАНОЛА ФЕРМЕНТАЦИЈОМ
МЕЃУПРОИЗВОДА ТЕХНОЛОГИЈЕ ПРЕРАДЕ ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ**

докторска дисертација

Нови Сад
2011

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	3
3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	5
3.1. Хемијски састав и добијање међу- и нуспроизвода прераде шећерне репе.....	6
3.1.1. Хемијски састав шећерне репе.....	6
3.1.2. Технологија прераде шећерне репе.....	8
3.1.3. Међу- и нуспроизводи технологије шећерне репе.....	11
3.1.3.1. Екстракциони сок.....	11
3.1.3.2. Ретки сок.....	13
3.1.3.3. Густо сок.....	14
3.1.3.4. Меласа.....	15
3.2. Технологија етанола.....	19
3.2.1. Припрема сировине.....	19
3.2.2. Ферментација хранљиве подлоге.....	20
3.2.2.1. Производни микроорганизми.....	21
3.2.2.2. Метаболички путева процеса ферментације квасцем.....	23
3.2.2.3. Фактори који утичу на процес ферментације.....	25
3.2.2.4. Кинетика процеса ферментације.....	27
3.2.2.5. Оптимизација ферментације поступком одзивне површине.....	30
3.2.3. Издвајање и пречишћавање етанола.....	32
3.2.4. Квалитет и примена етанола.....	32
3.2.5. Преглед могућности копроизводње шећера и етанола.....	34
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА.....	36
4.1. Припрема сировине и дефинисање услова ферментације.....	37
4.1.1. Производни микроорганизми и припрема инокулума.....	37
4.1.2. Хранљива подлога.....	37
4.1.3. Услови ферментације.....	38
4.2. Аналитички поступци.....	38
4.2.1. Анализа квалитета сировина.....	38
4.2.2. Анализа узорака ферментационе течности.....	39
4.2.3. Статистичка обрада података.....	39
4.2.4. Прорачун кинетичких параметера.....	40

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	41
5.1. Састав сировина.....	42
5.2. Одабир комерцијалног соја квасца.....	45
5.3. Испитивање тока ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе.....	47
5.3.1. Испитивање тока ферментације екстракционог сока.....	47
5.3.2. Испитивање тока ферментације ретког сока.....	50
5.3.3. Испитивање тока ферментације густог сока.....	53
5.3.4. Испитивање тока ферментације меласе.....	56
5.4. Оптимизација ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе.....	59
5.4.1. Оптимизација ферментације екстракционог сока.....	60
5.4.2. Оптимизација ферментације ретког сока.....	66
5.4.3. Оптимизација ферментације густог сока.....	72
5.4.4. Оптимизација ферментације меласе.....	78
5.5. Кинетика ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе.....	84
5.5.1. Кинетика ферментације екстракционог сока.....	84
5.5.2. Кинетика ферментације ретког сока.....	87
5.5.3. Кинетика ферментације густог сока.....	89
5.5.4. Кинетика ферментације меласе.....	92
6. ЗАКЉУЧАК.....	95
7. ЛИТЕРАТУРА.....	99
8. ПРИЛОЗИ.....	104

1. УВОД

Технологија етанола представља значајну научну дисциплину с обзиром на велику употребну вредност и широку заступљеност њених примарних и секундарних производа. Етанол има примену у прехранбеној, фармацеутској и хемијској индустрији као и у другим гранама индустрије где се употребљава као растварач, адитив или полазна сировина за различите технолошке процесе. Етанол произведен из биомасе поступком ферментације представља модеран вид енергије и значајну замену течним фосилним горивима или, у смеши са гасовима, замену природном гасу. Чињеница да је етанол обновљив и еколошки прихватљив извор енергије довела је до драстичног повећања његових производних капацитета. Тренутно се у свету највише етанола производи из шећерних и скробних сировина.

Због вишка шећера на светском тржишту, Европска Унија је смањила економска улагања у производњу шећера за око 30% са циљем спречавања извоза шећера на друга тржишта. Новонастали услови су приморали многе европске шећеране да траже алтернативну примену шећерне репе. Поред тога, повећање приноса и ефикасности производње шећера, као и чињеница да је његова производња из шећерне трске јефтинија, су додатни узроци смањења потражње за шећерном репом. Стога су многе фабрике шећера преусмериле део својих производних капацитета ка производњи етанола или су се потпуно преорјентисале на ову технологију.

Србија има велики потенцијал за производњу енергије из обновљивих извора, нарочито из биомасе. У нашој земљи се за производњу етанола традиционално примењује меласа. Преко 50% етанола произведеног у Србији добија се ферментацијом ове сировине. Меласа, као нуспроизвод прераде шећерне репе, се добија на крају овог процеса и у складу са тим трошкови њеног добијања су значајно већи у поређењу са трошковима добијања међупроизвода као што су екстракциони, ретки и густо сок. Будући да састав наведених међупроизвода прераде шећерне репе зависи од локалитета и врсте земљишта на којем се ова култура гаји, као и примењеног технолошког поступка јавила се потреба за испитивањем добијања етанола ферментацијом екстракционог, ретког и густог сока који се добијају у домаћим фабрикама шећера. Утврђивање оптималних услова, приноса, исплативости и техничких захтева производње етанола из различитих међупроизвода технологије прераде шећерне репе је веома значајно. Ови подаци ће омогућити фабрикама које прерађују шећерну репу валидну процену да ли је у одређеном тренутку економичније производити шећер или етанол, који је оптималан однос капацитета прераде који ће усмерити ка добијању сваког од ових производа, као и који од међупроизвода прераде представља најповољнију сировину за добијање етанола. Избор сировине за ферментацију свакако ће зависити и од периода године, односно од чињенице да ли је у току кампања прераде шећерне репе када су доступни сви међупроизводи у свежем стању или су на располагању само складиштени међупроизводи.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Истраживања из оквира овог рада обухватиће испитивање тока ферментације подлога на бази екстракционог, ретког и густог сока као међупроизвода, и меласе као нуспроизвода технологије прераде шећерне репе квасцем *Saccharomyces cerevisiae*. На основу утврђеног утицаја примењеног соја квасца на састав проферментисаних подлога, статистичком анализом извршиће се избор соја међу примењеним комерцијалним сојевима/типovima квасца доступним на нашем тржишту.

Анализом резултата тока ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе одабраним сојем квасца, дефинисаће се параметри значајни за моделовање применом поступка одзивне површине функције. Добијени модели допринеће бољем разумевању утицаја различитог почетног садржаја шећера, трајања ферментације и међусобних интеракција ових фактора на одабране одзиве тока ферментације хранљивих подлога на бази међупроизвода технологије прераде шећерне репе.

Поред наведеног, циљ овог рада је дефинисање оптималних вредности почетног садржаја шећера и трајања ферментације екстракционог, ретког и густог сока као међупроизвода и меласе као нуспроизвода технологије прераде шећерне репе, применом методе жељене функције у комбинацији са полиномским зависностима посматраних одзива .

Наставак истраживања биће изведен са циљем провере валидност добијених резултата, односно њихове примењивости у увећаним размерама. Будући да ток ферментације зависи од метаболичке активности ћелија производног микроорганизма, део испитивања из оквира овог рада усмериће се ка утврђивању кинетике раста производног микроорганизма, кинетике потрошње лимитирајућег супстрата и кинетике добијања етанола као жељеног производа из горенаведених сировина у увећаним размерама уз примену одабраног соја квасца.

3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

3.1. Хемијски састав и добијање међу- и нуспроизвода прераде шећерне репе

Будући да се на светском тржишту налази значајно већа количина шећера у односу на његову потражњу, цена овог производа изузетно варира (Tian et al., 2009). Овакви тржишни услови су разлог зашто многи произвођачи шећера у Европи траже алтернативно тржиште за шећерну репу која је првобитно била намењена производњи шећера. Једна од могућности за превазилажење насталог проблема је преусмеравање прераде дела шећерне репе на производњу етанола, који се може применити за надокнаду дела утрошене енергије (Krajnc and Glavič, 2009). Увођење производње етанола у постојеће фабрике шећера представља атрактивну опцију јер омогућава варирање количина произведеног шећера и етанола у зависности од услова који владају на тржишту. На овај начин се може уравнотежити потражња и понуда шећера и умањити варирање његове цене (Tian et al., 2009).

3.1.1. Хемијски састав шећерне репе

Шећерна репа (*Beta vulgaris* L.), члан породице *Chenopodiaceae*, је биљка чији корен садржи високу концентрацију сахарозе. За производњу шећера из шећерне репе користи се искључиво корен после прве године развића. Корен шећерне репе је претежно вретенастог облика и на њему се разликују четири дела: глава, врат, тело и реп корена. Главу представља надземни део шећерне репе из којег израста лишће. Врат корена се простира између најнижих лисних дршки и горњег бочног корења. Тело корена чини део корена од горњег бочног корења до доњег уског дела на којем пресек корена има пречник око 1 cm. Доњи најдужи део корена је реп корена. Са аспекта технологије шећера највећи значај има тело корена јер је у њему садржан највећи део сахарозе. Врат корена се такође употребљава за производњу шећера, док су глава и реп сиромашни шећером, садрже доста нешећера и не користе се у даљој преради већ се одсецају и користе за исхрану стоке (Шушић и сар., 1994). Састав шећерне репе, у погледу шећерних и нешећерних компоненти, није исти у целом корену. Садржај шећерних компоненти као и чистоћа су већи у средини корена у односу на главу и реп (van der Poel et al., 1998).

У Табели 1 (van der Poel et al., 1998) је приказан уобичајен хемијски састав шећерне репе. Приказани подаци престављају само приближне вредности јер многи фактори попут услова гајења, састава и припреме земљишта, употребе ђубрива и сорте шећерне репе, утичу на садржај компоненти. Променљивост садржаја се може уочити на примеру садржаја сахарозе у репи, који варира у опсегу између 14 и 20 g/100g репе (van der Poel et al., 1998).

Са становишта технологије етанола најзначајнија компонента шећерне репе је сахароза, дисахарид који квасац дејством ензима инвертазе разлаже на глукозу и фруктозу. Ове шећере квасац помоћу зимазног комплекса може директно да преведе у етанол и угљендиоксид. Од моносахарида се у шећерној репи налазе пентозе, које неки квасци асимилују као извор угљеника, али их ниједан сој ферментацијом не преводи у етанол, и хексозе. Укупна количина моносахарида у шећерној репи износи свега 0,1-0,2 g/100g шећерне репе, не рачунајући глукозу и фруктозу које су присутне као градивне јединице сахарозе. Рафиноза је трисахарид који се у шећерној репи налази у количини 0,05-0,1 g/100g шећерне репе, али се током производње шећера концентрише па је у меласи има 1-3 g/100g. Сви сојеви врсте *Saccharomyces cerevisiae* помоћу ензима β -фруктофуранозидазе разлажу рафинозу на фруктозу и мелибиозу. Само сојеви квасца доњег врења могу да разлажу мелибиозу помоћу ензима α -галактозидазе на глукозу и галактозу (Шушић и сар., 1994; van der Poel et al., 1998).

Табела 1: Уобичајен хемијски састав шећерне репе

Компонента	g/100g шећерне репе	% *
1. Вода	73,0 – 76,5	
2. Сува материја	23,5 – 27,0	
2.1. Сахароза	14,0 – 20,0	
2.2. Нешећерне компоненте	7,0 – 9,5	
2.2.1. Компоненте нерастворљиве у води	4,5 – 5,0	
Целулоза	0,9 – 1,2	21 - 24
Хемицелулоза	1,1 – 1,5	22 - 31
Пектинске материје	1,9 – 2,4	20 - 48
Лигнин	0,1 – 0,3	2 - 7
Протеини	0,1 – 0,4	2 - 9
Сапонини	0,05 – 0,1	1 - 2
Липиди	0,05 – 0,1	1 - 2
Пепео	око 0,1	око 2
2.2.2. Растворљиве компоненте	око 2,5	
2.2.2.1. Органске компоненте без азота	0,9 – 1,1	36 - 44
Моносахариди	0,1 – 0,2	
Рафиноза	0,05 – 0,1	
Пектинске материје	0,1 – 0,3	
Органске киселине	0,2 – 0,3	
Липиди	око 0,05	
Сапонини	око 0,1	
Друге компоненте	око 0,1	
2.2.2.2. Компоненте са азотом	1,0 – 1,2	40-48
Протеини	0,4 – 0,7	
Бетаин	0,2 – 0,3	
Амино киселине	0,2 – 0,3	
Амиди	0,02 – 0,1	
NH ₄ ⁺ соли и нитрати	око 0,05	
Друге компоненте	око 0,02	
2.2.2.3. Неорганске компоненте (пепео)	0,4 – 0,5	16-20
Калијум	око 0,2	
Натријум	0,02 – 0,04	
Калцијум	0,04 – 0,06	
Магнезијум	0,04 – 0,05	
Хлориди	0,01 – 0,03	
Сулфати	око 0,02	
Фосфати	0,05 – 0,09	
Гвожђе/Алуминијум	око 0,01	
Силикати	око 0,01	

* % у односу на садржај компоненти нерастворљивих у води / садржај растворљивих компоненти

Из прегледа хемијског састава шећерне репе (Табела 1) се види да шећерне репа садржи 1,0-1,2 g/100g шећерне репе компоненти са азотом, а од тога 0,4-0,7 g/100g шећерне репе чине протеини. У ћелијском соку шећерне репе аминокиселине се налазе у слободном облику, растворене у ћелијском соку и повезане у облику протеина и амида. У ћелијском соку шећерне репе идентификоване су следеће аминокиселине: неутралне аминокиселине: гликол, аланин, γ -аминобутерна киселина, валин, леуцин, изолеуцин, фенилаланин, тирозин, серин, треонин, цистин, метионин, пролин и триптофан; киселе аминокиселине: аспарагинска и глутаминска киселина; базне аминокиселине: лизин, аргинин и хистидин (Шушић и сар., 1994).

Шећерна репа садржи амида свега 0,02-0,1 g/100g шећерне репе (Табела 1). Од амида у шећерној репи претежно се налазе аспарагин, глутамин и оксиамидна киселина. У технолошком процесу прераде шећерне репе у фази алкализације и при упаравању сока, издваја се амонијак и при том настају глутаминска, пиролитонкарбонска, аспарагинска и оксална киселина (Шушић и сар., 1994).

Шећерна репа садржи бетаин у количини од 0,2-0,3 g/100g шећерне репе. Највећа количина бетаина се налази у глави и врату корена репе. У технолошком процесу производње шећера, бетаин пролази непромењен кроз фазе процеса и сакупља се, готово квантитативно, у меласи (Шушић и сар., 1994).

На основу истраживања утврђено је да способност квасца да произведе високе концентрације етанола у великој мери зависи од састава хранљиве подлоге и заштитне функције коју имају неки нутријенти. У том смислу, асимилујућа једињења азота су најважније компоненте ферментационог медијума (Вai et al., 2008). Заштитни ефекат амонијум-соли на раст, вијабилност и ферментативну способност квасца је експериментално потврђен (Jones et al., 1994). Од азотних једињења квасац може да асимилује аминокиселине, амиде киселина и свега 5% бетаина. Многи аутори као добре изворе азота који подстичу раст ћелија квасца истичу глутамин, аспарагин и амонијум-соли. У складу са тим су и резултати који потврђују утицај амонијум-соли на раст и метаболизам ћелија квасца (Сао et al., 2006).

Садржај амонијум-соли и нитрата износи око 0,05 g/100g шећерне репе. При алкализацији амонијум-соли се разлажу и при том се ослобађа амонијак (Шушић и сар., 1994). Поред минералних материја наведених у Табели 1, шећерна репа садржи и микроелементе као што су: баријум, бор, кобалт, молибден, никл, селен и др.

Испитивања додатка различитих суплемената синтетском медијуму за ферментацију помоћу квасца *Saccharomyces cerevisiae* указала су да натријум- и калијум-нитрат имају негативан утицај док амонијум-дихидрогенфосфат има стимулишући ефекат на продукцију етанола (Abdel-Fattah et al., 2003). Dombek и Ingram (1986) су доказали заштитни ефекат који соли калцијума и магнезијума имају на раст, вијабилност и ферментативну способност квасца. Други аутори (Сао et al., 2006) су указали на утицај соли калијума и магнезијума на раст и метаболизам ћелија квасца.

Сапонини су површински активне материје које снижавају површински напон течности и узрокују пењење. Шећерна репа садржи сапонине у количини од око 0,1 g/100g шећерне репе (van der Poel et al., 1998).

3.1.2. Технологија прераде шећерне репе

Технолошки поступак производње шећера је континуалан и одвија се по фазама процеса које су међусобно повезане. Поред основног технолошког процеса производње шећера, технологија обухвата и помоћне процесе и операције у погонима за производњу енергије, помоћних материјала и дораду нуспроизвода.

Основни технолошки поступак производње шећера може се поделити у шест фаза по следећем хронолошком редоследу:

- припрема шећерне репе за екстракцију,
- екстракција шећера из резанаца,
- чишћење сока,
- концентрисање (упаравање) сока,
- кристализација сахарозе и
- дорада кристала.

Део фабрике у којем се одвијају прве четири фазе процеса и као међупроизвод добија густи сок , назива се „сирови део“ док се други део погона, у којем се из густог сока даљом прерадом добија конзумни кристал шећер као финални производ , назива „рафинерија“.

Припрема шећерне репе за екстракцију

Шећерна репа се вади из земље у јесен и рану зиму након чега се транспортује са поља до места преузимања у фабрици. Пре истовара се измери маса репе и оцени се њен технолошки квалитет. Шећерна репа која долази на прераду садржи преко 15% нечистоћа. У току воденог транспорта репе постиже се њено делимично прање и одстрањивање нечистоћа. За потпуно одстрањивање нечистоћа, ситних уломака и репића користе се уређаји за прање шећерне репе. Пре резања, репа се испира воденим раствором дезинфицијенса и оцеђује. Репе се реже на резанце кровастог профила, који обезбеђује максималну површину, крутост и порозност насутог слоја репе, што обезбеђује технолошки најповољније услове за екстракцију шећера.

Екстракција шећера из резанаца

Екстракција се изводи у противструјном току резанаца репе и воде, односно сока. Да би се омогућила екстракција шећера мора се разорити нативна структура ћелија, што се постиже загревањем. Овај процес се назива плазмолиза и постиже се загревањем на 75°C. Након плазмоллизе, услед разлике у концентрацијама, шећер дифузијом прелази из ткива репе у сок. Најповољнији услови за екстракцију су температура око 70°C, вредност рН између 5,5 и 6,0 и трајање око 60 min, односно што краће. Екстракциони сок треба да садржи што већу концентрацију шећера и што мање нешећера. Уобичајено се постиже концентрација од око 15% суве материје и чистоћа сока између 86-88%. Количина сока добијена од 100 kg резанаца репе у току екстракције износи 110-120 kg. У излуженим резанцима заостаје око 0,5% шећера рачунато на репу, а садржај суве материје резанаца на излазу из дифузера је око 6%. Након пресовања резанаца, део сока који је заостао у њима се враћа у поступак екстракције као вода од пресовања.

Чишћење сока

Циљ чишћења сока је уклањање нешећера и постизање термостабилности сока како се током даље термичке обраде, приликом упаравања и кристализације, не би мењао. Екстракциони сок се на излазу из дифузера филтрира кроз слој резанаца, али и поред тога садржи суспендоване делове резанаца (мрве) који се прво уклањају. Затим се током 20-30 min соку поступно додаје кречно млеко и сатурациони муљ у количини од 0,2-0,3% СаО рачунато на сок. Након прве алкализације, соку се додаје кречно млеко у количини од 2% СаО рачунато на сок. Уколико се друга алкализација врши уз истовремено увођење гаса CO₂ до сатурације онда се овај поступак назива дефекосатурација. У поступцима код којих се главна алкализација изводи посебно, алкални сок се подвргава сатурацији. После прве сатурације или дефекосатурације исталожени нешећери, као тешко растворне соли калцијума, коагулати колоида и адсорбовани нешећери на СаСО₃ честицама, образују сатурациони муљ. Суспендоване честице сатурационог муља одвајају се од сока декантацијом и филтрацијом. У већини поступака један део сатурационог муља, око 30%, се враћа на прву алкализацију, а остали део се издваја из процеса. Након декантовања, сок алкалности око 0,08% СаО и вредности рН око 11, у току друге сатурације се сатурише до алкалности око 0,02% СаО тј. до оптималног алкалитета друге сатурације од рН 9,0-9,5. Након друге сатурације, настали талог СаСО₃ се издваја филтрацијом и уобичајено враћа на прву

алкализацију. Сок после ове филтрације се назива ретки сок. Ретки сок се може допунски чистити поступцима сулфитације, адсорпције или јонске измене. Температура у току алкализације и прве сатурације се одржава на 80-90°C, а току друге сатурације сок се загрева преко 95°C. Током чишћења се смањује концентрација сока услед додавања кречног млека и воде којом се испира сатурациони муљ на филтерима. Вода за прање сатурационог муља се назива ислад и враћа се у ретки сок. Од око 100 kg шећерне репе се добија око 115-130 kg ретког сока концентрације 10-15% суве материје.

Концентрисање (упаравање) сока

Уклањањем воде из ретког сока, који садржи 10-15% суве материје, добија се густи сок са 60-65% суве материје. Из 100 kg шећерне репе се добија просечно око 130 kg ретког сока из којег се упаравањем добија око 30 kg густог сока што значи да се у току концентрисања отпари око 100 kg воде по 100 kg шећерне репе. Упаравање се обавља на вишестепеној отпарној јединици. Пара која настаје упаравањем сока назива се секундарна пара, која се користи за загревање свих међуфазних производа и одржавање топлотног режима у поступку. Највећи потрошачи секундарних пара су уређаји за кристализацију и загревачи екстракционог сока и сокова у току чишћења. Од расподеле секундарних пара и коришћења топлотне енергије кондензне воде зависи укупна потрошња паре у процесу производње шећера, која се у фабрикама шећера у Србији креће око 40-50 kg примарне паре на 100 kg шећерне репе. У току упаравања добро очишћен ретки сок се по хемијском саставу битно не мења. Евентуалне промене могу бити пораст садржаја бојених материја, редукујућих шећера и алкалитета сока.

Кристализација сахарозе

Кристаллизацијом се из пресићеног раствора издваја сахароза, а у засићеном раствору, матичном сирупу, заостају нешећери. Густи сок, који садржи 60-65% суве материје, је незасићен раствор, који се даљим упаравањем доводи у област пресићености, која је повољна за кристализацију сахарозе. Циљ кристализације је да се што краћим поступком издвоји што чистији кристал шећер и да последњи сируп, меласа, садржи што мање шећера. При уобичајеним условима кристализације, укувавањем густог сока у вакуум апаратима на око 80°C стање пречишћености, повољно за раст кристала, се постиже тек при 80% суве материје у сирупу. Задовољавајућа пресићеност се може постићи и хлађењем сирупа, што се у пракси и примењује. Овај процес се назива продужена кристализација, а обавља се у хладњачама са мешањем. У вискозним пресићеним растворима шећера отежано је упаравање воде па се због скраћења времена кувања ово изводи под сниженим притиском у вакуум апаратима. У фабрикама шећера у Србији уобичајено се примењује шема кувања са три производа (А, В, С). При оваквом поступку кристализације, конзумни кристал се издваја након прве (А) кристализације, а матични сируп из треће (С) кристализације из меласе. Кристални шећер издвојен после друге (В) кристализације се враћа у поступак и раствара у густом соку. На тај начин се повећава концентрација и чистоћа густог сока. Овако добијен раствор сировог шећера у густом соку, раствор В, се назива стандардни раствор и служи за кување тј. кристализацију конзумног кристал шећера. Кристални шећер издвојен након трећег (С) степена кристализације се враћа у поступак и раствара у сирупу заосталом након издвајања конзумног кристал шећера. Овај раствор се користи за кување тј. кристализацију другог (В) производа. Суспензија кристала у сирупу се назива шећеровина. Шећеровина после кристализације, укувавања и хлађења, се одводи на центрифуге у којима се одвајају кристали шећера од матичног сирупа. У току центрифугирања, додавањем воде и паре, са површине кристала се одстрањује слој сирупа. Овај поступак се назива рафинација. Кристали после прве (А) кристализације, одвојени од матичног сирупа у центрифугама, садрже још око 0,5-1,5% воде. Чистоћа ових кристала треба да износи 99,8%.

Дорада кристала

Конзумни шећер извојен из центрифуга се вибрационим транспортером допрема до сушаре кристала. Шећер се суши у ротационим коморним сушарама до садржаја воде од 0,03%. У првом делу сушаре шећер се суши у паралелној струји топлог ваздуха и шећера, а у другом делу у противструјном току хладног ваздуха и шећера. На тај начин шећер се суши и хлади па из сушаре излази са температуром 25-30°C. Ваздух за сушење шећера се изводи из сушаре у уређај за отпашивање у којем се издваја прах шећер понет струјом ваздуха. Осушен шећер се уобичајено транспортном траком допрема до складишта у којем се на уређају за просејавање класира по величини зрна и из њега се издвајају евентуално настале грануле односно слепљени кристали. Испод уређаја за класирање постављају се ваге и машине за паковање шећера или се шећер после класирања складишти у расутом стању у силосима (Шушић и сар., 1994; van der Poel et al., 1998).

Од помоћних погона, непосредно везаних за процес производње шећера, треба поменути следеће (Шушић и сар., 1994):

- погон за производњу паре и електричне енергије („енергану“),
- погон за производњу кречног млека и сатурационог гаса („кречану“) и
- погон за дораду излужених резанаца („сушару“).

3.1.3. Међу- и нуспроизводи технологије прераде шећерне репе

Међупроизводи технологије прераде шећерне репе су екстракциони, ретки и густој сок док меласа представља нуспроизвод ове технологије.

3.1.3.1. Екстракциони сок

У савременој индустрији шећера сок из репе се екстрахује обрадом танко изрезаних резанаца водом температуре 70-75°C. При екстракцији репиних резанаца не екстрахује се само сахароза већ и различити нешећери у зависности од коефицијента дифузије. Садржај суве материје у тако добијеном екстракционом соку износи 15-20%, а вредност рН се налази у опсегу 5,5-6,5. Екстракциони сок је тамно обојен и има карактеристичан и интензиван мирис. Услови екстракције треба да обезбеде прелазак што мање количине нешећера у екстракциони сок. Чистоћа екстракционог сока се креће у опсегу 85-90% што значи да је садржај шећера 85-90%, а садржај нешећера 10-15% рачунато на суву материју (Hinková and Bubník, 2001). Поред растворених нешећера екстракциони сок садржи 0,6-1,0% суспендованих нечистоћа, као што су делови резанаца и нерастворни делови хумуса и песка (Шушић и сар., 1994). У Табели 2 (Шушић и сар., 1994) приказан је преглед прелаза појединих компоненти шећерне репе у екстракциони сок.

Табела 2: Удео компоненти у екстракционом соку у односу на њихов садржај у шећерној репи

Назив компоненте	% прелаза у екстракциони сок
Сахароза	98
Протеини	30
Укупан азот	57
K ₂ O	80
Na ₂ O	60
MgO	60
CaO	10
P ₂ O ₅	75
SO ₃	70
Si	90
Соли	70

Из Табеле 2 се може уочити да у излуженим репиним резанцима заостаје свега око 2% сахарозе. Осим рафинозе, која непромењена пролази кроз цео процес производње шећера, са становишта ове технологије од олигосахарида је значајна још и кестоза. Кестоза је трисахарид који се не налази у шећерној репи. Настаје синтезом сахарозе и фруктозе под дејством ензима инвертазе у току процеса производње шећера, нарочито у фази складиштења и припреме репе за екстракцију (Шушић и сар., 1994). Кестоза је идентификована у свим међупроизводима прераде шећерне репе и у меласи (van der Poel et al., 1998).

Садржај пектинских материја у шећерној репи износи 1,9-2,4 g/100g шећерне репе (Табела 1). Већи део пектинских материја у облику протопектина остаје у излуженим резанцима, док у екстракциони сок, при уобичајеним условима екстракције шећера, прелази 0,2-0,3% рачунато на суву материју сока (Шушић и сар., 1994).

Као што се може уочити на основу приказаних података (Табела 2), протеини прелазе у екстракциони сок у количини од свега 30%, и то углавном из пресечених или оштећених ћелија приликом резања репе у резанце. Осталих 70% протеина, који се налазе у унутрашњим ћелијама репе, коагулишу при загревању, не прелазе у сок и остају у излуженим резанцима. У екстракционом соку су присутне све слободне аминокиселине садржане у шећерној репи и део који настаје хидролизом растворљивих протеина, који при екстракцији прелазе у екстракциони сок (Шушић и сар., 1994; van der Poel et al., 1998). Укупан садржај аминокиселина у екстракционом соку варира у опсегу између 11,91-26,05 mmol/100 g шећера (Шушић и сар., 1994). У Табели 3 (Шушић и сар., 1994) приказан је удео сваке присутне аминокиселине у односу на њихов укупан садржај у екстракционом соку.

Табела 3: Удео појединих аминокиселина у укупном садржају аминокиселина у екстракционом соку

Аминокиселина	удео у укупном садржају аминокиселина % mol
Глутамин	45
Глутаминска киселина	3
Аспарагин	6
Аспарагинска киселина	6,5
Аминобутерна киселина	11
Серин	7,5
Аланин	5,5
Изолеуцин	3
Леуцин	3
Валин	2,5
Треонин	2
Аргинин	< 1
Пролин	1
Глицин	1
Метионин	< 1
Тирозин	2
Фенилаланин	< 1
Лизин	< 1
Хистидин	< 1
Триптофан	< 1

Од укупног садржаја минералних материја у шећерној репи (Табела 1), у екстракциони сок прелази око 0,4% у односу на почетни садржај (Шушић и сар., 1994). У Табели 4 (Шушић и сар., 1994) приказан је садржај појединих минералних материја у односу на укупан садржај кондуктометријски одређеног пепела у екстракционом соку.

Табела 4: Удео појединих минералних материја у укупном садржају минералних материја у екстракционом соку

Минерална материја	удео у укупном садржају минералних материја %
K ₂ O	35 - 60
Na ₂ O	6 - 18
CaO	5 - 17
MgO	5 - 15
Al ₂ O ₃ + Fe ₂ O ₃	1 - 5
P ₂ O ₅	9 - 20
Cl	1 - 8
SiO ₂	0 - 2

Релативно слаба екстракција калијумових и натријумових соли (Табела 2) се може објаснити задржавањем њихових јона од стране негативно наелектрисаних колоида сока шећерне репе. Од осталих катјона слабо се екстрахује калцијумов јон јер се у репи налази претежно у облику нерастворљивих једињења. Поред тога, фосфорна и сумпорна киселина вероватно улазе у састав неких сложених једињења и зато се слабо екстрахују.

У процесу прераде шећерне репе око 40% сапонина из репе прелази у екстракциони сок па у складу са тим садржај сапонина у екстракционом соку износи 0,08 – 0,16 g/100g суве материје (van der Poel et al., 1998).

3.1.3.2. Ретки сок

У технологији шећера, екстракциони сок се пре упаравања и кристализације мора чистити. Чишћење подразумева издвајање суспендованих грубих нерастворних нечистоћа, неутрализацију сока и издвајање што веће количине кохидно и јонски растворених нешећера. Растворени нешећери се уклањају тако што се претходно преведу у нерастворни облик, талог, који се декантацијом или филтрацијом одваја од раствора (Шушић и сар., 1994). Током чишћења екстракционог сока уклањају се бројне нечистоће укључујући поливалентне анионе као што су сулфати, фосфати, цитрати и оксалати, који се таложу у облику калцијумових соли, и велики органски молекули као што су протеини, сапонини и пектини, који формирају агрегате у присуству поливалентних катјона. Такође, при алкалним условима прости шећери, глукоза и фруктоза, и глутамин, као најзаступљенија аминокиселина у екстракционом соку (Табела 3), се конвертују до хемијски стабилних карбоксилних киселина. Када се не би на овај начин третирани, шећери и амини би у каснијем току ометали издвајање сахарозе кристализацијом (Krajnc and Glavič, 2009). Основни задатак сатурације је таложње вишка калцијум-хидроксида у облику калцијум-карбоната, увођењем угљендиоксида. Образовани калцијум-карбонат служи за физичко-хемијско чишћење сока и побољшање његових филтрационих особина. Физичко-хемијско дејство калцијум-карбоната при сатурацији испољава се у адсорпцији нешећера сока (Шушић и сар., 1994). Након филтрације, добија се ретки сок, међупроизвод светло-жуте боје, који садржи 12-14% шећера (Krajnc and Glavič, 2009).

У фази алкализације, под дејством хидроксилних јона, долази до разградње инвертног шећера. Продукти разградње у присуству аминокиселина и амонијака доводе до образовања обојених материја, меланоидина, који повећавају обојеност сока. Део редукујућих шећера који заостаје у ретком соку се разлаже током упаравања и доводи до опадања алкалитета шећерних сирупа.

У процесу чишћења екстракционог сока, под дејством калцијум-хидроксида, долази до денатурације и таложења протеина. Услед алкалне хидролизе део протеина се разлаже на ниже молекуле и не таложи се коагулацијом, тако да у соку после сатурације остаје још око 10% од првобитно присутне количине протеина у екстракционом соку. Преостали део протеина се у даљем поступку чишћења сока, у алкалној средини и при вишим температурама, разлаже до аминокиселина. У току чишћења сока, аминокиселине се трансформишу у друга једињења, а један део се одстрањује адсорпцијом. При алкализацији амонијум-соли и амиди се разлажу и при том се ослобађа амонијак. Дејство ензима шећерне репе престаје у фази алкализације сока услед инактивације дејством температуре и база (Шушић и сар., 1994).

Важно је напоменути да сапонини са калцијумом образују нерастворљиве соли које се таложе и издвајају при чишћењу сока (Шушић и сар., 1994). На овај начин се уклони око 90% сапонина присутних у екстракционом соку (van der Poel et al., 1998).

Од укупног садржаја минералних материја у шећерној репи (Табела 1) након пречишћавања у ретком соку остаје око 0,2% у односу на почетни садржај у шећерној репи (Шушић и сар., 1994).

3.1.3.3. Густо сок

У фабрикама шећера упаравање има два основна задатка, и то: да се ретки сок концентрује до оптималног садржаја суве материје, који у индустријским условима износи до 65-75%, и да се обезбеди довољно топлотне енергије за екстракцију, чишћење сока и кристализацију шећера (Шушић и сар., 1994). Упаравање ретког сока је вишестепено, а на крају се добија густо сок са садржајем шећера 55-65% (Hinkova and Bubnik, 2006).

У току упаравања у соку се дешавају извесне хемијске промене, које се испољавају у следећем:

- промена алкалности сока,
- таложење неких компонената сока и
- разлагање шећера и повећање обојености сока.

Наведене промене нису значајне у квантитативном смислу, услед чега се квоцијенти чистоће ретког и густог сока врло мало разликују. Извесно повећање квоцијента чистоће густог сока у односу на ретки сок је последица таложења неких нешећера у току упаравања.

Током упаравања, аминокиселине се разграђују или трансформишу у друга једињења па је њихов укупан садржај у густом соку за око 50% мањи у односу на садржај у ретком соку. Делом током алкализације, а делом током упаравања ретког сока, из амида издвајањем амонијака настају глутаминска, пиролидонкарбонска, аспарагинска и оксална киселина. Промена алкалности се врши у смислу смањења концентрације хидроксилних анјона. Ова појава је узрокована управо разлагањем амида аминокиселина као што су аспарагин и глутамин.

Издвајање талога се дешава услед смањења растворљивости многих соли калцијума (као што су калцијум-карбонат и калцијум-сулфат) у концентрованијим растворима сахарозе, разлагања глиоксалне, оксаминске киселине и алантиона при чему се као талог образује калцијумоксалат, као и услед таложења калцијумкарбоната услед разлагања растворљивијег калцијум-хидрогенкарбоната (насталог из дела калцијум-карбоната током сатурације).

Разлагање сахарозе током упаравања зависи од дужине задржавања сока у поступку упаравања и температуре кључања. Смањење садржаја сахарозе обично није веће од 0,01% изражено на масу репе. Повећање обојености сока није проузроковано само разлагањем сахарозе него, можда у већој мери, продужавањем процеса разлагања редукујућих шећера, а такође и њиховом кондензацијом са аминокиселинама (Шушић и сар., 1994).

3.1.3.4. Меласа

Хемијски састав меласе се мења из године у годину услед промене квалитета репе и различите дужине складиштења ове културе на складиштима произвођача или у фабричким каналима. Уобичајен састав меласе чини око 50% сахарозе, око 30% нешећера и око 20% воде. Међутим, хемијски састав меласе је сложен јер се у њој налази преко 200 различитих органских и неорганских једињења. Од нешећера меласе око 10% чине соли међу којима највише има калијумових. Остатак нешећера чине органске супстанце међу којима највише има азотних једињења. Свакако, главни састојак меласе су угљени хидрати, претежно сахароза, које има око 50%.

У зависности од квалитета шећерне репе и примењене технологије прераде садржај компонената меласе варира у следећем опсегу (%): сува материја 74-84, сахароза 46-52, укупан азот 1,4-2,1, бетаин 4-7, редукујуће материје 1,0-2,5, рафиноза 0,5-2,0, млечна киселина 4-6, сирћетна киселина 0,2-0,5, мравља киселина 0,2-0,5, бојене материје 4-8, пепео 6-11. Наведене вредности могу да варирају у широким границама у зависности од фактора који утичу на квалитет шећерне репе. Тако на пример, садржај рафинозе у меласи може да достигне и вредност од 10%. Овако велики садржај рафинозе у меласи указује на дуг период и врло неповољне услове складиштења репе. У Табели 5 (Шушић и сар., 1994) приказан је средњи хемијски састав меласе која садржи 83,5% суве материје и 16,5% воде.

Од угљених хидрата у меласи се увек налазе глукоза, фруктоза, сахароза и рафиноза, а у зависности од начина прераде и квалитета сировине у малим количинама се могу наћи још арабиноза, галактоза и ксилоза. Поред наведених шећера меласа садржи и трисахарид кестозу. Инвертни шећер меласе делом потиче из репе у којој га има у количини до 0,1% , а значајан део инвертног шећера се образује хидролизом сахарозе током прераде шећерне репе.

Табела 5: Просечан хемијски састав меласе са 83,5% суве материје

Органска супстанца	%	Минерална материја	%
Сахароза	51,0	K ₂ O	4,30
Рафиноза	1,0	Na ₂ O	0,90
Инвертни шећер	0,5	CaO	0,26
Протеини	5,0	MgO	0,14
Глутаминска киселина	4,0	SiO ₂	0,10
Бетаин	6,0	Al ₂ O ₃	0,07
Остала N-једињења	1,5	Fe ₂ O ₃	0,02
Органске киселине	1,5	CO ₃ ²⁻	3,50
Остале органске супстанце	1,5	SO ₄ ²⁻	0,55
		Cl ⁻	1,60
		PO ₄ ³⁻	0,06
Укупно органских супстанци	72,0	Укупно минералних материја	11,50

Садржај азота у меласи варира у границама од 1,4-2,1%. Око трећине азотних материја чини бетаин, а остало аминокиселине, протеини, амиди, меланоидини и у незнатној количини соли амонијака. Удео појединих азотних компоненти у укупном садржају азота у меласи је приказан у Табели 6 (Шушић и сар., 1994).

Табела 6: Удео појединих азотних компоненти у укупном садржају азота меласе

Азотна компонента	Садржај азотне компоненте		
	g/100 g меласе	g/100 g суве материје меласе	g/100 g укупног садржаја азотних компоненти у меласи
Амонијум соли	0,0383	0,0485	2,54
Амиди	0,0246	0,0313	1,63
Аминокиселине	0,4583	0,5768	30,49
Бетаин и протеини	0,9839	1,2520	65,37
Укупно	1,5051	1,9086	100,00

Меласа, која не садржи довољну количину азотних материја нема одговарајући састав за производњу етанола. Меласа може да садржи и преко 2% азота, али само око 0,4-0,6% ћелије квасца могу да искористе. Садржај аминокиселина у меласи се одређује хемијским путем, али се може и проценити на основу садржаја укупног азота јер између садржаја укупног и аминокиселина постоји извесна законитост приказана у Табели 7 (Шушић и сар., 1994).

Меласа садржи 17 аминокиселина, а највише глутаминске и аспарагинске киселине. Од укупног садржаја глутаминске киселине у меласи око 25% се налази у слободном облику. Остала количина у процесу производње шећера прелази у цикличну пиролитонкарбонску киселину. Аминокиселине су у хемијском смислу стабилне и изузев глутаминске киселине се не мењају у условима производње шећера и доспевају готово непромењене у меласу.

Табела 7: Однос између садржаја укупног азота и аминокиселина меласе

Укупан азот (g/100 g меласе)	Амино азот (g/100 g меласе)
< 0,8	0,10
0,9-1,0	0,15
1,1-1,2	0,20
1,3-1,4	0,25
1,5-1,6	0,30
>1,7	0,35

Међутим, укупна количина аминокиселина у меласи се смањује са дужином трајања кампање па тако уколико кампања траје дуже од 90 дана, садржај аминокиселина на крају кампање може да опадне за 13-16% у односу на првобитни што се објашњава утицајем услова чувања репе. У Табели 8 (Шушић и сар., 1994) је приказан садржај аминокиселина у хидролизованом меласи са укупном количином азота од 1,93%.

Органске компоненте без азота се у меласи налазе у мањим концентрацијама. Састоје се од продуката разлагања хемицелулозе, продуката топлотног разлагања сахарозе, неиспарљивих и испарљивих органских киселина, пектинских материја и продуката њиховог разлагања као и читавог низа других једињења.

Табела 8: Садржај аминокиселина у хидролизованом меласи

Аминокиселина	g/100 g меласе
Глутаминска киселина	4,17
Леуцин-изолеуцин	0,55
Аспарагинска киселина	0,37
Гликохол	0,30
Валин	0,30
γ-Аминобутерна киселина	0,30
Аланин	0,28
Тирозин	0,21
Пролин	0,11
Фенилаланин	0,09
Цистин	0,05
Серин	0,05
Лизин	0,03
Аргинин	0,03
Хистидин	0,03

Меласа садржи неиспарљиве и испарљиве органске киселине. Неиспарљиве органске киселине потичу из репе (оксална, ћилибарна, глутарна и др.) или се образују из моносахарида при чишћењу сока (млечна, глутинска, апоглутинска и др.). У састав испарљивих киселина улазе мравља, сирћетна, пропионска, бутерна, изобутерна, валеријанска и капронска. Ове киселине се не налазе у шећерној репи већ настају деловањем природно присутних микроорганизама у екстракционом соку пре алкалисања. Меласа чији је садржај испарљивих киселина већи од 1,2% се сматра дефектном. Најнеповољнија је бутерна киселина јер у количини од 0,6 g/100 g меласе изазива комплетну инхибицију у ћелијама квасца.

Неорганске компоненте меласе се састоје из соли карбоната, сулфата, хлорида, нитрата и малих количина фосфата калијума, натријума, калцијума, магнезијума, алуминијума и гвожђа. Садржај пепела у меласи варира у широким границама и креће се око 6-11%. Око 80% пепела чини калијум-карбонат, а 20% чине хлориди, сулфати, фосфати и силикати. Меласа садржи врло мало фосфата јер је највећи део уклоњен у облику калцијум-фосфата током чишћења сока.

Садржај калијума у меласи је од великог значаја за њену примену у производњи етанола. Присуство калијума у меласи је потребно за испољавање активности многих ензима, који учествују у оксидо-редукционим реакцијама и учествују у процесу раста и размножавања квасца.

Међу супстанце које неповољно делују на раст и размножавање квасца убраја се и SO₂. У меласи се налази у малој количини (0,01-0,05%) и потиче од SO₂ који се користи за закишељавање воде за екстракцију репиних резанаца.

Садржај нитрита у меласи се креће око 0,013-0,17%. Нитрити су веома штетни за ћелије квасца. При концентрацијама нитрита од 0,004% у хранљивој подлози успоравају се раст и размножавање, а при вишим концентрацијама долази до изумирања ћелија квасца. Међутим, присуство нитрита у меласи је не чини непогодном за производњу етанола. Такву меласу треба закиселити, загрејати и проводити кроз њу ваздух док се целокупна количина азот(IV)-оксида не уклони из ње.

Поред једињења наведених у Табели 5, меласа садржи и велики број микроелементата који имају велики значај када се меласа користи у ферментативној индустрији. Витамини у меласи потичу из репе, али се у току процеса њене прераде знатан део витамина разори због алкалне средине јер су витамини најпостојанији у слабо киселој средини. Садржај витамина у меласи шећерне репе варира у широким границама, а у Табели 9 (Шушић и сар., 1994) су приказне просечне вредности.

Табела 9: Садржај витамина у меласи шећерне репе

Витамин	µg/100 g меласе
Тиамин (B ₁)	130,0
Рибофлавин (B ₂)	41,0
Пиридоксин (B ₆)	540,0
Никотинска киселина	5100,0
Пантотенска киселина	13000,0
Фолна киселина	21,0
Биотин	5,3

У меласи и њеним растворима су присутне соли, које се састоје од катјона јаких база (K⁺ и Na⁺) и анјона слабих органских киселина (млечне, сирћетне, глутарне и др.). Тиме се објашњава постојање пуферних смеша, које имају способност да се одупру промени рН при промени садржаја минералних материја или база у растворима. Поред тога пуферском капацитету меласе доприноси и садржај аминокиселина и протеина. Моћ пуферовања зависи од састава нешећера и њихове количине у меласи, углавном од односа соли калијума, натријума, калцијума и магнезијума, а такође и од количине аминокиселина азота. Уколико је нижи квоцијент чистоће меласе, утолико је већи садржај супстанци које имају способност пуферовања (Шушић и сар., 1994).

Меласа се као основна сировина примењује у различитим биотехнолошким поступцима. У нашој земљи највеће количине меласе се користе за производњу етанола и пекарског квасца при чему је производња етанола по обиму најзначајнија. Поступак припреме меласе за ферментацију квасцем *Saccharomyces cerevisiae* обухвата њено разблажење, корекцију вредности рН и стерилизацију. При високим концентрацијама супстрата услед високог осмотског притиска, фактора који изазива стрес ћелија квасца, инхибиран је раст квасца и формирање производа метаболизма. Стога је циљ разблажења меласе је свођење концентрације супстрата на оптималну. До значајне инхибиције супстратом долази при концентрацијама шећера у опсегу 5-25% док при концентрацији од 40% долази до потпуне инхибиције раста. Приликом разблажења меласе, осим о концентрацији шећера, треба водити рачуна и о концентрацији осталих нутријената који могу инхибирати ферментацију. Највећи проблем у том смислу је висок садржај неорганских соли у меласи (Ergun and Mutlu, 2000). У технологији етанола се меласа водом разблажује до концентрације шећера 10-18%. При већим концентрацијама, осим инхибиције супстратом, дошло би и до инхибиције етанолом као производом, време ферментације би се продужило, а количина заосталог шећера би била висока. Мале концентрације шећера се не користе из економских разлога (Шушић и сар., 1994).

3.2. Технологија етанола

Производња алкохолних пића је стара колико и људска цивилизација, а производња чистог етанола је отпочела у периоду између 12. и 14. века истовремено са унапређењем извођења дестилације. Производња етанола је одувек била у блиској вези са пољопривредном производњом. Када део усева или производа добијених прерадом пољопривредних култура није било могуће пласирати на тржиште због велике удаљености и тешког очувања квалитета током транспорта, коришћени су за производњу етанола (Roehr, 2001).

Технологија етанола је значајна научна дисциплина савременог динамичног развоја, с обзиром на велику употребну вредност и широку заступљеност њених примарних и секундарних производа. Етанол као главни производ има примену у прехранбеној, фармацеутској и хемијској индустрији, као и у другим индустријским гранама где се употребљава као растварач, адитив или полазна сировина за различите технолошке процесе. Док се технологија производње етанола из житарица и шећерне репе раније развијала са циљем добијања максимално пречишћеног етанола због употребе у производњи пића и фармацији, данашња производња етанола са циљем његове примене као горива наметнула је захтев за јефтинијом производњом, како би се постигла конкурентност етанола са ценом нафте (Dodić et al., 2009 b; Ranković, 2007). У овом смислу је значајан одабир сировине јер њена цена може да износи 40-70% од укупних трошкова производње (Dodić et al., 2010; Cara et al., 2008), при чему се морају узети у обзир и трошкови поступка припреме сировине за ферментацију као и принос етанола.

Технологија етанола се може поделити у три фазе:

- припрема сировине,
- ферментација хранљиве подлоге и
- издвајање и пречишћавање етанола.

3.2.1. Припрема сировине

Етанол се може произвести ферментацијом из свих сировина које садрже шећере које квасац може да метаболише или полисахариде који се могу разградити до асимилабилних шећера. Када се разматра могућност индустријске производње етанола из одређених сировина узимају се у обзир садржај угљених хидрата, цена и доступност сировине, као и цена технолошког поступка производње етанола из одређене сировине (Мојовић et al., 2007). Сировине за производњу етанола се могу класификовати према врсти угљених хидрата на сировине које садрже просте шећере (шећерна репа, шећерна трска, топинамбур и др.), сировине које садрже скроб (житарице, кукуруз, кртоласти усеви и др.) и лигноцелулозне сировине (дрво, траве, комунални чврсти отпад и др.). Шећерне сировине се помоћу квасаца могу директно разградити метаболичким путем па не захтевају скупу припрему која најчешће подразумева само разблажење и стерилизацију. Припрема скробних сировина подразумева њихово чишћење, уситњавање, топлотни третман и затим ензимску хидролизу применом комерцијалних ензима или ензима слада (ошећерење). Превођење лигноцелулозних сировина до облика који је доступан квасцима је копликовано, скупо и представља велики недостатак са становишта њихове примене у производњи етанола (Escobar et al., 2009). Међутим, због ниске цене и велике доступности лигноцелулозних сировина улаже се у развој технологије конверзије ових сировина до ферментабилних шећера. Будући да само у Војводини постоји око 1000 m² неискоришћеног обрадивог земљишта јасно је да наша земља поседује велики потенцијал за узгој пољопривредних култура намењених технологији етанола (Dodić et al., 2009 c).

3.2.2. Ферментација хранљиве подлоге

Процес ферментације припремљене хранљиве подлоге се одвија у специјално опремљеним судовима, односно биореакторима, под анаеробним условима. Ферментација хранљиве подлоге са циљем производње етанола према режиму рада се може изводити: дисконтинуално, семиконтинуално (доливно и циклично-шаржно) или континуално. При избору начина ферментације узимају се у обзир особине и цена сировине која ће се користити, непоходне инвестиције као и цена потребне опреме, продуктивност и принос етанола.

Дисконтинуални (шаржни) поступак

Применом овог начина ферментације у току 36-48 часова угљенохидратне компоненте хранљиве подлоге се преведу у етанол са приносом од 90-95% у односу на теоријски. Предности овог начина ферментације су ниске инвестиције, мали захтеви у погледу стерилизације и контроле процеса, мали ризик у смислу финансијских губитака, лако вођење процеса, могућност дефинисања трајања ферментације тако да се оствари висок ниво конверзије, мали ризик од инфекције и мутације ћелија с обзиром на релативно кратко трајање. Недостаци дисконтинуалне ферментације су смањење продуктивног времена на 80% будући да се око 20% времена утроши на пражњење, прање, стерилизацију, хлађење, загревање и поновно пуњење биореактора, честе стерилизације, чешће припремање инокулума, смањење продуктивности због *lag*-фазе раста. Дисконтинуална ферментација се препоручује фабрикама малог капацитета, у случају постојања ризика од контаминације и мутације производног микроорганизма и када се примењује дисконтинуално издвајање производа.

Семиконтинуални доливни поступак

Код доливног поступка ферментације хранљива подлога се дозира у прецизно дефинисаним временским размацима са тежњом да се концентрација извора угљеника одржава константном. На овај начин инхибиција супстратом се одржава на минимуму јер се супстрат додаје оном брзином којом се троши. Процес траје док се не достигну лимитирајуће концентрације етанола, или док се не утроши неки од нутријената. Предности овог начина ферментације су постизање високих приноса у добро дефинисаном времену трајања процеса (током ферментације не додају се нити одводе ћелије производног микроорганизма), висок ниво флексибилности, смањен ризик од мутација производног микроорганизма, као и ризик од контаминације, могућа оптимизација услова раста. Недостаци доливног поступка ферментације су непродуктивно време током пуњења, загревања, стерилизације, хлађења, пражњења и прања ферментатора, виши захтеви у погледу радне снаге, или скупи инструменти за компјутерско вођење и честе стерилизације.

Семиконтинуални циклично-шаржни поступак

Током циклично-шаржне ферментације, један део садржаја ферментатора са производним микроорганизмом се изводи из ферментатора, а додаје се иста запремина свеже хранљиве подлоге. Предности овог начина ферментације су потреба за судом за инокулум само на почетку рада, изостанак непродуктивних операција прања и поновне стерилизацију, висока флексибилност, мало хабање и оштећење инструмената услед стерилизације и мали захтеви у погледу контроле процеса. Применом овог система, време ферментације се смањује због високе концентрације и активности ћелија квасца. Недостаци су повећање инвестиција због веће запремине ферментатора, висок ризик од контаминације и мутација услед дугог трајања процеса.

Континуални поступак

Овај начин ферментације је технолошки најинтересатнији јер се производни микроорганизам током процеса све време налази у експоненцијалној фази раста (циклуса раста) па стога продуктивност етанола, као примарног метаболита, стално расте. Предности овог поступка су

максимално омогућена механизација и аутоматизација, мали захтеви у погледу радне снаге, мање запремине ферментатора због изостанка непродуктивног времена, константан квалитет производа и мало хабање и оштећење инструмената услед стерилизације (Мојовић и сар., 2007; Roehr, 2001). При оптималном процесу ферментације мора се одржавати вијабилност ћелија уз истовремено спречавање прекомерног раста производног микроорганизма, раста бактерија као контаминирајућих микроорганизма и формирања нежељених продуката. Успешна производња етанола ферментацијом се може изводити применом слободних или имобилисаних ћелија производног микроорганизма. Обе технике имају своје предности и недостатке.

Примена имобилисаних ћелија производног микроорганизма има следеће предности у односу на примену суспендованих ћелија: концентрација ћелија је висока, код континуалног извођења ферментације је елиминисан проблем испирања ћелија при високој брзини разблажења, елиминисано је скупо издвајање и рецикулација ћелија, захваљујући високој концентрацији ћелија и великим вредностима протока постиже се висока запреминска продуктивност, погодни су услови у микроокружењу попут контакта између ћелија, градијента хранљивих материја и продуката метаболизма као и вредности рН па се може постићи већи учинак биокатализатора, нпр. већи принос производа и може се побољшати генетска стабилност. Недостаци примене имобилисаних ћелија производног микроорганизма су следећи: највеће ограничење имобилизације је у погледу излучивања жељеног производа од стране ћелија производног микроорганизма, приликом примене имобилисаних ћелија значајна су дифузиона ограничења и контрола услова је отежана услед хетерогености система, код живих ћелија, раст и ослобађање гасова представљају значајан проблем и могу изазвати поремећај матрикса за имобилизацију (Shuler and Kargi, 1992).

3.2.2.1. Производни микроорганизми

Производни микроорганизам за индустријску примену треба да поседује најбољу могућу комбинацију особина узимајући у обзир карактеристике самог процеса и расположиве опреме. Производња етанола у многоме зависи од избора микроорганизма за ферментацију. Микроорганизам треба да испуњава следеће захтеве:

- висок принос производа по јединици асимилованог супстрата,
- високу способност ферментације,
- толерантност на етанол,
- способност очувања вијабилности при вишим температурама,
- стабилност при адекватним условима ферментације,
- толерантност при ниским вредностима рН.

Квасци и бактерије, који су широко распрострањени у индустријској производњи етанола, имају одређене предности и недостатке (Roehr, 2001). Ферментација шећера се у класичним поступцима изводи најчешће помоћу квасаца рода *Saccharomyces*. Поред врсте *Saccharomyces cerevisiae* у индустријској пракси се користе и *Saccharomyces uvarum (carlsbergensis)*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Kluyveromyces sp.* Поред квасаца и неке бактерије као нпр. *Zymomonas mobilis*, *Clostridium sporogenes* и *Thermoanaerobacter ethanolicus* могу производити етанол, али се оне мање примењују у индустрији, осим у посебним случајевима (Wуman, 1996).

Најбоље проучена бактеријска врста за производњу етанола је *Zymomonas mobilis*, анаеробна грам-негативна бактерија која производи етанол из глукозе *Entner-Doudoroff*-овим метаболичким путем. Ова бактерија може дати висок принос етанола (97% у односу на теоријски принос етанола из глукозе), без инхибиције метаболизма етанолом (Мојовић и сар., 2007). Упркос томе, *Z. mobilis* није погодан микроорганизам за индустријску производњу етанола. Један од разлога је то што као супстрат може да користи искључиво D-глукозу, D-фруктозу и сахарозу, а раст на сахарози је праћен формирањем олигомера фруктозе (левана) и сорбитола, што значајно умањује принос

етанола. Наведене чињенице чине ову бактерију чини непогодном за производњу етанола из међупроизвода прераде шећерне репе као и из меласе. Биомаса бактерије *Z. mobilis* се не може користити за исхрану животиња па би се, у случају да ова бактерија као производни микроорганизам замени највише примењивани квасац *Saccharomyces cerevisiae*, појавио проблем уклањања њене биомасе. Такође, код континуалног поступка производње етанола, ова бактерија показује осцилације у понашању (Daugulis et al., 1997; McLellan et al., 1999).

Широм света, готово целокупна производња етанола се врши употребом једне врсте квасца *Saccharomyces cerevisiae* (Knauf and Kraus, 2006). Основна предност квасца *S. cerevisiae* је то што може да користи различите супstrate као што су глукоза, малтоза, галактоза, фруктоза и сахароза. Уопштено говорећи квасци могу да расту и ефикасно производе етанол при вредности рН око 3,5-6,0 и температури око 28-35°C. При нижим вредностима рН смањује се ризик од контаминације током ферментације. Ипак, иако су почетне брзине производње етанола веће на повишеној температури, око 40°C, укупна продуктивност је смањена услед појачане инхибиције етанолом што је и мана квасца *S. cerevisiae* (Roehr, 2001).

Селекционисано је више хиљада сојева за производњу етанола или CO₂, као и велики број сојева за пекарство, производњу вина, пива, јаких алкохолних пића и етанола као горива. Комерцијално доступни сојеви квасца значајно се разликују у погледу својих карактеристика. Разлике су у највећој мери изражене у погледу:

- толерантности према различитим температурама, вредностима рН, садржају шећера, органских киселина и етанола,
- способности флокулације,
- стварању пене,
- брзини раста, приносу и стабилности,
- продукцији инхибитора и резистентности на различите инхибиторне факторе,
- ензимској активности и искоришћењу извора угљеника (Knauf and Kraus, 2006).

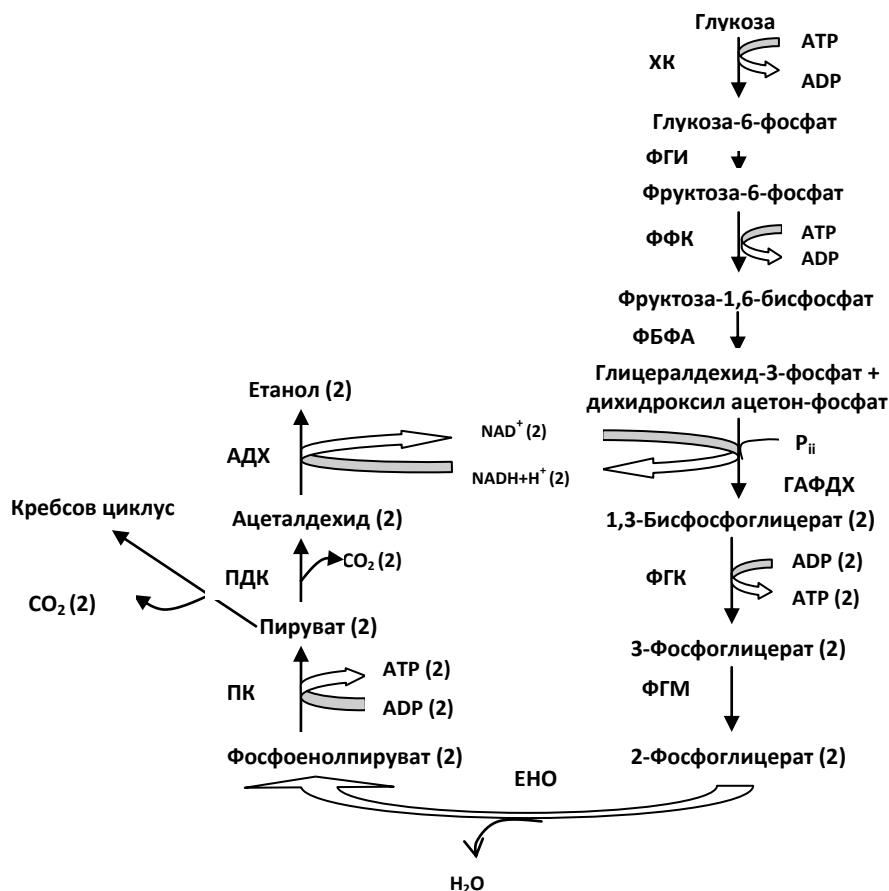
Табела 10: Карактеристике различитих форми квасца

Карактеристике	Ефикасност ферментације	Складиштење
Суви активни квасац		
оптимална стабилност; не захтева чување у фрижидеру;	прихватљива ефикасност ферментације; добра вијабилност; потребна рехидратација; препоручљиво прилагођавање средини;	складиштење ван фрижидера; уобичајен рок употребе 2 године; не захтева учесталу набавку; најнижа цена складиштења;
Свежи квасац		
оптимална активност; не захтева рехидратацију; краћа <i>lag</i> фаза у ферментацији; погодна форма за сојева чије је сушење отежано;	одлична ефикасност ферментације; висока вијабилност; нема потребе за рехидратацијом; минимални захтеви у погледу прилагођавања средини;	ограничена дужина чувања; упакован је у фрижидеру стабилан најмање 6 недеља;
Квасно млеко		
већа активност у односу на суви активни и свежи формовани квасац; погодно за директну инокулацију ферментатора;	супериорна ефикасност ферментације; највиша вијабилност; нема потребе за рехидратацијом; није потребна аклиматизација;	лоша стабилност при складиштењу; дужина чувања у фрижидеру је 1-2 недеље, а за стабилизовано квасно млеко може бити и преко 3 месеца;

Квасац је комерцијално доступан у форми квасног млека (минимум 16% суве материје), свежег квасца (минимум 27% суве материје) и сувог активног квасца (минимум 94% суве материје). Када се за производњу етанола примењује суви активни квасац, одлика ферментације је дуга *lag* фаза због времена потребног за рехидратацију и прилагођавање ћелија производног микроорганизама условима средине. Свежи формовани квасац и квасно млеко отпочињу ферментацију релативно брзо и имају већу вијабилност, међутим дужина њиховог складиштења је ограничена на значајно краћи период. Стабилност свежег формованог квасца и квасног млека зависи од њиховог састава као и од соја квасца (Knauf and Kraus, 2006; Bellissii and Ingledew, 2005). Најважније карактеристике различитих форми квасца су наведене у Табели 10 (Knauf and Kraus, 2006)

3.2.2.2. Метаболички путеви процеса ферментације квасцем

У хранљивим подлогама на бази међупроизвода прераде шећерне репе најзаступљенији извор угљеника је сахароза, дисахарид чије усвајање од стране квасца започиње екстерном ензимском хидролизом β -фруктофуранозидне везе молекула помоћу ензима инвертазе. Под анаеробним условима квасци метаболишу D-глюкозу и D-фруктозу стварајући етанол и угљендиоксид уз ослобађање одређене количине енергије коју је потребно одводити из система. Основни метаболички пут ферментације је гликолиза (Embden-Meyerhof-Parnas-ов или ЕМР пут), кроз који се метаболише један молекул глукозе, а производ су два молекула пирувата, што је илустровано на Слици 1. Под анаеробним условима, пируват се даље редукује до етанола уз отпуштање угљендиоксида (Madigan, 2000). У аеробним условима, када је крајњи акцептор електрона кисеоник, разлагање угљених хидрата се одвија као респирација, а настали пируват преко ацетил-СоА, као интермедијера, улази у циклус трикарбонских киселина (Кребсов циклус) (Barnett, 1976; Fugelsang and Edwards, 2007).



Слика 1: Метаболички пут настајања етанола ферментацијом у *Saccharomyces cerevisiae*

HK-хексокиназа, FGI-фосфоглукоизомераза, PFK-фосфофруктокиназа, FBFA-фруктоза бифосфат алдолаза, ГАФДХ-глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, FGK-фосфоглицерат киназа, ПДК-пируват декарбоксилаза, АДХ-алкохол дехидрогеназа

Утврђено је да се ферментација угљених хидрата одвија у анаеробним условима, а да се приликом аерисања она прво успорава, а затим и потпуно зауставља уз појаву респираторног типа метаболизма (Пастеров ефекат) (Hoogerheide, 1971). Пошто се под анаеробним условима из молекула глукозе стварају само два молекула АТФ-а, ћелија мора убрзати усвајање глукозе као би обезбедила довољну количину АТФ-а, што се постиже активацијом ензима фосфофруктокиназе. До пораста брзине усвајања глукозе под анаеробним условима долази када је концентрација глукозе у средини око 0,9 g/l (Fugelsang i Edwards, 2007). Међутим, алкохолна ферментација квасцима је могућа и под аеробним условима уколико је концентрација D-глукозе у подлози већа од 9 g/l, а овај феномен је познат под називом Кребтри ефекат (Barnett, 1997). При наведеној концентрацији глукозе долази до репресије формирања митохондријских елемената и респираторних ензима. Неки квасци рода *Dekkera* (*Brettanomyces*) чак глукозу ферментишу брже под аеробним него под анаеробним условима што за последицу има синтезу веће количине сирћетне киселине. Наведени феномени су познати под заједничким називом негативан Пастеров ефекат (Weusthuis, 1994).

Теоријски принос ферментације износи 0,511 g етанола и 0,489 g угљендиоксида по 1 g метаболисане глукозе. Два АТФ-а настала током гликолизе се утроше за биосинтезу ћелија квасца, која обухвата различите енергетски захтевне реакције. Стога је продукција етанола чврсто повезана са растом ћелија квасца, односно биомаса се мора производити као копроизвод. Без континуалне потрошње АТФ-а услед раста ћелија квасца, гликолиза као метаболички пут глукозе би била одмах обустављена због интрацелуларне акумулације АТФ-а, који инхибира фосфофруктокиназу (ФФК), један од најважнијих ензима за регулацију гликолизе. Овај основни принцип је у супротности са применом имобилисаних ћелија за производњу етанола ферментацијом, нарочито са методом смештања ћелија унутар матрица гела којом се ћелије квасца физички ограничавају на запремину гел-честице и значајно се успорава њихов раст (Vai et al., 2008).

Анаеробна конверзија глукозе у етанол квасцем *Saccharomyces cerevisiae* је редокс неутрална будући да се NAD^+ утрошен на почетку ЕМР метаболичког пута регенерише приликом превођења пирувата у етанол. Када интермедијери ЕМР метаболичког пута као прекурсори учествују у синтези ћелијског материјала баланс је нарушен вишком продукованог $NADH$ који није преведен поново до NAD^+ (Karasu Yalçin, Ozbas; 2005). Уколико не би постојали други процеси за регенерацију NAD^+ дошло би до обуставе метаболизма. Током анаеробног раста *Saccharomyces cerevisiae*, $NADH$ се не може оксидовати кисеоником већ мора бити утрошен на настанак или формирање споредних производа као што је глицерол (Karasu Yalçin, Ozbas; 2004). У већини случајева, глицерол током ферментације настаје у количини од око 1,0% m/v. Већа вредност рН култивационе течности, повећан осмотски притисак као и настанак мање пирувата због искоришћења интермедијера гликолизе за биосинтезу стимулишу конверзију дихидрокси фосфата у глицерол. Други споредни производи као што су органске киселине (првенствено ћилибарна киселина) и виши алкохоли настају у значајно мањим количинама (Ingledew, 1999).

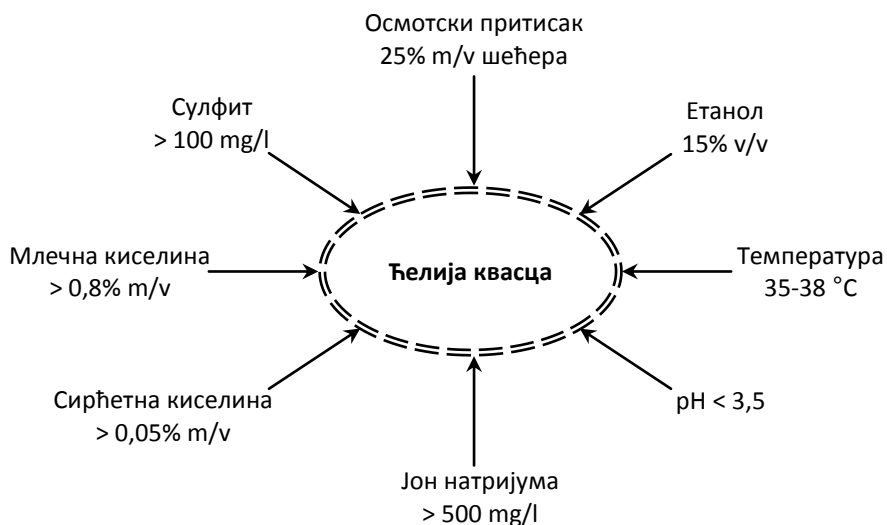
Виши алкохоли настају из оне количине пирувата која се не утроши на образовање етанола већ ацето-млечне киселине, чијом трансформацијом настаје изобутанол. Осим ове мање количине, настале из извора угљеника, већа количина насталих виших алкохола су споредни продукти метаболизма аминокиселина присутних у хранљивој подлози. Када у хранљивој подлози понестане одређене аминокиселине неопходне за синтезу протеина, квасац усваја неку другу аминокиселину из хранљиве подлоге и врши трансминацију односно преноси њену аминок групу на слободну кето киселину. Кето киселина која заостаје након дезаминације мање важне аминокиселине се даље декарбоксилује до алдехида и редукује до вишег алкохола, који се након тога излучује из ћелије квасца. Алдехиди су споредни производи ферментације који настају делом декарбоксилацијом кето киселина, а делом из ЕМР метаболичког пута.

Производња споредних производа као и раст ћелија квасца преусмеравају неке од интермедијера гликолизе ка одговарајућим метаболичким путевима, умањујући у извесној мери принос етанола. У индустријским условима, принос етанола израчунат на основу укупног садржаја шећера у хранљивој подлози, без умањења за вредност заосталих шећера, може да износи 90-93% у односу на теоријски принос етанола из глукозе (Ingledew, 1999).

Квасци могу да користе различите изворе неорганског и органског азота, као што су аминокиселине (последично пептиди и протеини), полиамини, нуклеинске киселине и витамини, за инкорпорацију у структурна и функционална азотна једињења ћелије. Хранљиве подлоге се обично обогаћују смешама аминокиселина иако квасци могу да расту користећи само амонијум соли као изворе азота будући да поседују способност биосинтезе свих аминокиселина. Амонијум јони, присутни у хранљивој подлози или добијени разградњом других азотних компоненти, могу бити асимиловани приликом синтезе неких аминокиселина, нарочито глутамата и глутамина, које могу служити као донори амино група за друге аминокиселине. Основни пут асимилације амонијум јона је реакција NADPH-зависне глутамат дехидрогеназе, која формира глутамат из α -кетоглутарата и амонијум јона. Када је концентрација амонијум јона ниска, а потребна за синтезу азотних компоненти, активира се синтеза глутамина из α -кетоглутарата и амонијум јона у ATP зависној реакцији. Глутамин је потребан као важан прекурсор за неколико важних метаболичких путева као што су синтеза аспарагина, триптофана, хистидина, аргинина, карбамил-фосфата, СТР, АМР, GMP, глюкозамина и NAD. Квасац *S. cerevisiae* не може да користи нитрате као изворе азота за разлику од других врста квасаца (Waker, 1997).

3.2.2.3. Фактори који утичу на процес ферментације

У индустријској производњи етанола се тежи постизању високих концентрација етанола у проферментисаној подлози будући да се на тај начин могу остварити значајне уштеде енергије приликом издвајања етанола и обраде џибре која након тога заостаје (Bai et al., 2008). Да би се постигле високе концентрације етанола потребно је уклонити факторе који изазивају стрес ћелија квасца (Ingledew, 1999). Неки од фактора стреса за квасац *S. cerevisiae* су заправо утицаји околине попут недостатка нутријената, високе температуре и контаминације, док су други последица метаболизма самог квасца као што је акумулација етанола. На Слици 2 су сумарно приказани најважнији фактори стреса (Ingledew, 1999). Важно је напоменути да већина њих има синергистичко дејство па је утицај на ћелије квасца изузетно јак и доводи до смањења вијабилности и приноса етанола (Bai et al., 2008).



Слика 2: Фактори који могу да изазову стрес ћелија квасца *S. cerevisiae* током ферментације

Иако је квасац *Saccharomyces cerevisiae* осмотолерантан велике почетне концентрације супстрата изазваће осмотски шок. Инхибиција раста и синтезе различитих производа метаболизма десифе се при концентрацији супстрата од 5-25% шећера док при концентрацији од око 40% шећера долази до потпуне инхибиције раста (Thatipamala et al., 1992; Ergun and Mutlu, 2000). Великом осмотском притиску могу да допринесу и други састојци подлоге. Етанол је типичан примарни метаболит па га стога ћелије које су у фази раста производе око 30 пута брже у односу ћелије које не расту (Ingledew, 1999).

Када садржај етанола у проферментисаној подлози достигне 11-12%, смањује се број ћелија које се размножавају пупљењем и повећава се стрес на ћелије (Мојовић и сар., 2007). Познавање механизма инхибиторног дејства етанола на ћелије квасца је предуслов за боље искорашћење потенцијала сојева као и за оптимизацију процеса ферментације. Етанол утиче на неке од кључних ензима гликолизе попут хексокиназе и алкохол дехидрогеназе, као и на усвајање нутријената и мембрански потенцијал (Casey and Ingledew, 1986). У многим случајевима, инхибиторно дејство етанола је интензивније услед присуства споредних производа ферментације као што су ацеталдехид и ацетати и других фактора стреса попут високе температуре. Масне киселине, нарочито незасићене (палмитолеинска и олеинска) су главне компоненте мембране које се одупиру инхибиторном дејству етанола повећањем флуидности мембране и тако компензују смањење флуидности изазвано етанолом. За њихову синтезу неопходна је извесна количина кисеоника као и одговарајућа количина аминокиселина (Bullock, 2002; Мојовић и сар., 2007). Испитивањима физиологије квасца *S. cerevisiae* утврђено је да многи сојеви могу да толеришу више концентрације етанола него што се раније веровало, често и без прилагођавања и генетских модификација (Thomas and Ingledew, 1992).

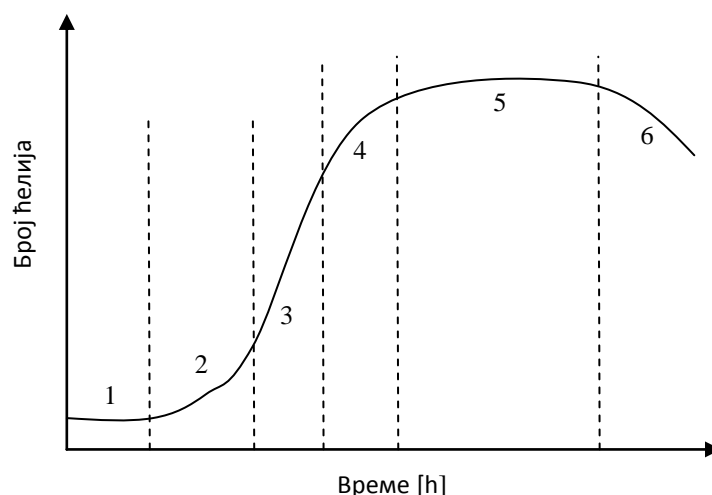
Поред инхибиције супстратом и производом, постоје и други фактори стреса, а температура је један од њих. Иако су високе температуре пожељне у индустријској производњи етанола због могућих уштеда на хлађењу, негативан утицај температуре је нарочито изражен при високим концентрацијама супстрата (Bai et al., 2008). Утврђено је да се при високој концентрацији супстрата трајање ферментације значајно продужава при порасту температуре са 17°C на 33°C као и да се количина проферментисаног шећера смањује при температурама изнад 25°C (Jones and Ingledew, 1994). Међутим, ниске температуре могу проузроковати мању продуктивност (Laopaiboon et al., 2009).

Током раста, за ћелије квасца је важно да одржавају константну интрацелуларну вредност рН. За раст и метаболичку активност ћелија неопходно је функционисање бројних ензима, а сваки од њих има највећу активност при оптималној вредности рН, која се налази у киселој области услед ацидофилне природе квасца. Када екстрацелуларна вредност рН одступа од оптималне, ћелије квасца морају да улажу енергију за транспорт јона водоника у ћелију или из ње у циљу одржавања оптималне вредности интрацелуларне рН. У случају превеликог одступања екстрацелуларне вредности рН од оптималног опсега, ћелије квасца не могу да одрже константну интрацелуларну вредност рН и тада ензими не функционишу нормално и ћелије квасца не могу да расту и производе етанол ефикасно (Narendranath et al., 2001). Оптимална вредност рН за производњу етанола се налази у опсегу између 5,0 и 5,5. Продукција етанола је потпуно инхибирана када је вредност рН испод 4,0. Пад рН испод оптималне вредности услед продукције органских киселина резултује мањом количином произведеног етанола током ферментације (Graves et al., 2006). Истраживањима је утврђено да у погледу производње етанола, приноса, максималних брзина усвајања супстрата, настанка производа и раста, као и специфичне брзине раста нису уочене значајне разлике између ферментација са и без регулације вредности рН (Turhan et al., 2010).

3.2.2.4. Кинетика процеса ферментације

У биотехнолошким процесима, где су катализатори живе ћелије, одигравају се истовремено и међусобно повезано раст, размножавање, трошење супстрата и синтеза примарних и секундарних метаболита. Кинетика ових процеса проучава брзине раста ћелија микроорганизама, трошења лимитирајућег супстрата из хранљиве подлоге и синтезе метаболита, као и утицај фактора околине на њих. Компоненте хранљиве подлоге се преносе из околне средине у ћелију, а различити производи метаболизма и вишак енергије из ћелије у околину. Када би се у потпуности описале све појаве које се дешавају између ћелије, околине и биореактора, онда би математички модел био веома компликован и практично нерешив. У пракси се користе поједностављени модели, који приближно реално описују микробиолошке процесе. Обично се користе модели са идеализованом интеракцијом између биокатализатора, фактора околине и биореактора (Роров, 2000).

Типична крива раста микроорганизама у дисконтинуалним условима је приказана на Слици 3, а добија се кад је брзина размножавања ограничена концентрацијом једног (лимитирајућег) супстрата у хранљивој подлози.



Слика 3: Типична крива раста микроорганизама у дисконтинуалним условима

1-lag фаза, 2-индукциони период, 3-експоненцијална фаза,
4-фаза успоравања, 5-стационарна фаза, 6-фаза одумирања

Након инокулације ћелија квасца у нови медијум следи *lag* фаза, односно временски период током којег нема уочљивог пораста броја ћелија квасца. Током ове фазе, ћелије квасца су метаболички активне, врше синтезу рибозома и ензима, прилагођавају се на нове физичке и хемијске услове окружења и припремају се за деобу (Bellisimi and Ingledew, 2005). У току индукционог периода се одвија брзо накупљање биомасе и производа различитих реакција. На индукциони период се наставља експоненцијална фаза раста током које се број ћелија повећава експоненцијално са временом. Брзина раста микроорганизама је у овој фази највећа и дефинише се помоћу једначине:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

где је: r_x - брзина раста микроорганизама [$g/l \cdot h$],

X - концентрација биомасе [g/l],

t - време [h], и

μ - специфична брзина раста микроорганизама [h^{-1}].

Током раста микроорганизама исцрпљује се лимитирајући супстрат (извор угљеника) у хранљивој подлози, а нагомилавају се производи метаболизма па долази до смањења брзине раста и почетка одумирања микроорганизама. Током фазе успоравања раста брзина раста опада до нуле. Брзина одумирања микроорганизама (се дефинише помоћу једначине:

$$r_d = \frac{dX}{dt} = -\mu_d \cdot X \quad (2)$$

где је: r_d - брзина одумирања микроорганизама [$g/l \cdot h$],
 X - концентрација биомасе [g/l],
 t - време [h], и
 μ_d - специфична брзина одумирања микроорганизама [h^{-1}].

Током стационарне фазе брзине раста и одумирања микроорганизама су изједначене, а током последње фазе брзина одумирања је већа од брзине раста и та фаза се назива фаза одумирања.

Вредност брзине раста током ферментације квасцем *S. cerevisiae* у дисконтинуалном биореактору зависи, осим од концентрације биомасе, зависи и од концентрације лимитирајућег супстрата и концентрације етанола, који се као производ метаболизма акумулира у подлози и може имати инхибиторно дејство на раст ћелија квасца. Стога се математички модели раста микроорганизама углавном свде на одређивање функционалне зависности која је описана помоћу једначине:

$$\frac{dX}{dt} = f(X, S, P) \quad (3)$$

где је: X - концентрација биомасе [g/l],
 t - време [h],
 S - концентрација лимитирајућег супстрата [g/l], и
 P - концентрација производа [g/l].

У литератури је познат *Monod*-ов модел дисконтинуалног раста микроорганизама без инхибиције, који се представља нелинеарном једначином:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (4)$$

где је: μ - специфична брзина раста микроорганизама [h^{-1}],
 X - концентрација биомасе [g/l],
 t - време [h],
 S - концентрација лимитирајућег супстрата [g/l],
 μ_m - максимална специфична брзина раста [h^{-1}], и
 K_s - константа засићења супстратом.

Максимална специфична брзина раста је у функционалној зависности са генерационим временом, односно временом које је потребно да се почетна количина биомасе удвостручи:

$$\mu_m = \frac{\ln 2}{t_g} \quad (5)$$

где је: μ_m - максимална специфична брзина раста [h^{-1}], и
 t - генерационо време [h].

Константа засићења супстратом представља меру афинитета микроорганизама према супстрату и једнака је концентрацији супстрата при којој је специфична брзина раста једнака половини максималне.

На брзину раста квасца *S. cerevisiae* током ферментације утиче и концентрација етанола као производа метаболизма који има инхибиторно дејство и та зависност се представља једначином:

$$\mu = \mu_m \frac{K_p}{K_p + P} \quad (6)$$

где је: μ - специфична брзина раста микроорганизама [h^{-1}],
 K_p - константа засићења производом,
 μ_m - максимална специфична брзина раста [h^{-1}], и
 P - концентрација производа [g/l].

Ако се узму у обзир претходна разматрања, израз за специфичну брзину раста има следећи облик:

$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) \quad (7)$$

где је: μ - специфична брзина раста микроорганизама [h^{-1}],
 μ_m - максимална специфична брзина раста [h^{-1}],
 S - концентрација лимитирајућег супстрата [g/l],
 K_s - константа засићења супстратом,
 K_p - константа засићења производом, и
 P - концентрација производа [g/l].

На брзину раста микроорганизама, поред наведених величина, утичу и врста извора угљеника, концентрација раствореног кисеоника, температура, вредност рН и други фактори које *Monod*-ов модел не узима у обзир па постоје бројне модификације овог модела, а често се дефинишу емпиријске једначине за адекватан опис експерименталних података.

Раст и размножавање микроорганизама је у директној вези са потрошњом хранљивих састојака из подлоге. Брзина потрошње супстрата се дефинише помоћу једначине:

$$r_s = - \frac{dS}{dt} \quad (8)$$

где је: r_s - брзина потрошње супстрата [$g/l \cdot h$],
 S - концентрација супстрата [g/l], и
 t - време [h].

Брзине раста и потрошње супстрата су функционално повезане на следећи начин:

$$r_x = Y_{X/S} \cdot r_s \quad (9)$$

где је: r_x - брзина раста микроорганизама [$g/l \cdot h$],
 $Y_{X/S}$ - принос биомасе по јединици супстрата [g/g], и
 r_s - брзина потрошње супстрата [$g/l \cdot h$].

што се и види из приложене једначине:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{маса насталих ћелија}}{\text{маса утрошеног супстрата}} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (10)$$

Брзина настајања производа се дефинише следећом једначином:

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (11)$$

где је: r_p - брзина настајања производа [$g/l \cdot h$],
 P - концентрација биомасе [g/l], и
 t - време [h].

Брзина настајања етанола као производа алкохолне ферментације је повезана са брзином раста на следећи начин:

$$r_p = Y_{P/X} \cdot r_x \quad (12)$$

где је: r_p - брзина настајања производа [$g/l \cdot h$],
 $Y_{P/X}$ - принос производа по јединици количине биомасе [g/g], и
 r_x - брзина раста микроорганизма [$g/l \cdot h$].

што се и види из приложене једначине:

$$Y_{P/X} = \frac{\text{маса створеног производа}}{\text{маса ћелија}} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (13)$$

Код образовања примарних метаболита значајна величина је принос производа по јединици утрошеног супстрата ($Y_{P/S}$) који се дефинише на следећи начин:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{маса створеног производа}}{\text{маса утрошеног супстрата}} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (14)$$

Између три дефинисана приноса постоји следећа функционална зависност:

$$Y_{P/S} = Y_{X/S} \cdot Y_{P/X} \quad (15)$$

где је: $Y_{P/S}$ – принос производа по јединици утрошеног супстрата [g/g],
 $Y_{X/S}$ - принос биомасе по јединици супстрата [g/g], и
 $Y_{P/X}$ - принос производа по јединици количине биомасе [g/g].

(Popov, 2000; Rivera et al., 2006; Baras i sar., 2009).

Са повећањем интересовања за примену алкохолне ферментације у различитим гранама индустрије, развијени су и различити кинетички модели за опис дисконтинуалне или континуалне ферментације са суспендованим ћелијама производног микроорганизма. Није реално очекивати да се било који кинетички модел може директно применити за одређени реалан процес. Стога при математичком моделовању треба поћи од најједноставнијег описа, а затим га модификовати и проширивати док се не добије адекватан кинетички модел процеса (Biol et al., 1998).

3.2.2.5. Оптимизација ферментације поступком одзивне површине

Класичан приступ експерименталном раду подразумева истраживања утицаја појединачних фактора на неку појаву или процес (*one at a time design*). Највећи недостатак ове технике је што не обухвата интеракције фактора те стога не приказује укупан утицај фактора на процес. Поступак одзивне површине (*RSM-response surface methodology*) је поледњих година постао најпопуларнија техника за оптимизацију хемијских и биохемијских процеса (Bas and Boyaci, 2007). Може се дефинисати као емпиријска статистичка техника примењена за регресиону анализу података

добијених из адекватно планираних експеримената симултаним решавањем система једначина (Allen, 2006). Свака од једначина назива се функција одзива, а њен геометријски приказ се назива одзивна површина, која се може приказати у три димензије или као контурна површина, у две димензије (Brereton, 2007). Одзивне функције су полиномског облика с обзиром да се квалитет фитовања експерименталних података може побољшати повећањем степена полинома. Овакви модели су посебно погодни за решавање оптимизационих проблема будући да је њима могуће описати интеракције великог броја фактора, а и процена квалитета фитовања полиномских модела се може лако одредити (Лазић, 2004). Дефинисање значајности појединих фактора могуће је урадити помоћу Студентовог t -теста, односно t -вредности повезаних са сваким од коефицијената полинома, које указују који фактори су значајни односно које од интеракција су битне за посматрани одзив. Најједноставнији полином који се може применити је полином првог реда који у обзир узима само линеарне утицаје појединачних фактора. Ако се као крајњи циљ поступка узме проналажење оптималног решења онда је неопходно користити полиноме другог реда за описивање одабраних одзива. Метода одзивне површине користи се за описивање бројних процеса (Јокић, 2010).

Принцип обраде података помоћу програма DESIGN-EXPERT се састоји у конвертовању индивидуалних одзива, Y_n , у индивидуалне жељене функције d_n чије се вредности крећу од 0 до 1. Вредност индивидуалне жељене функције "0" представља најлошију вредност, док вредност "1" представља најбољу вредност посматраног одзива. Укупна жељена функција (D) једнака је геометријској средини појединачних жељених функција. Високе вредности D показују најбоље вредности функција у систему које одговарају оптималном решењу посматраног система. Оптималне вредности експерименталних параметара одређују се из вредности појединачних жељених функција које оптимизују укупну жељену функцију (Jokić et al., 2010).

Будући да на сваки биотехнолошки процес може да утиче велики број фактора, обично је веома компликовано утврдити који од њих имају највећи утицај. Стога је пре оптимизације биотехнолошког процеса неопходно извршити његов скрининг. Оптимизација применом факторијалног плана и поступка одзивне површине је уобичајена у биотехнологији (Kalil et al., 2000). Многи истраживачи су примењивали ову технику за оптимизацију биотехнолошких процеса, нарочито за оптимизацију састава хранљиве подлоге, утврђивање оптималних вредности процесних параметара као што су рН, температура и аерација и других услова култивације. Постоје подаци о оптимизацији алкохолне ферментације помоћу *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 на делимично хидролизованом скробу као хранљивој подлози где су одређивани садржај угљених хидрата, степен почетног ошећерења, количина додатих амилаза, температура и трајање ферментације за постизање оптималних приноса (Bowman and Geiger, 1984). Други аутори су поступак одзивне површине применили за утврђивање утицаја одређених минералних материја на активност квасаца током ферментације (Marchetti and Guerzoni, 1991). Група истраживача је испитивала шаржну ферментацију помоћу *S. cerevisiae* са циљем добијања математичког модела као функције почетне количине редукујућих шећера, концентрације инокулума и неорганских извора азота као што је диамонијумхидроген-сулфат и оптимизације наведених фактора ради постизања веће продуктивности (Cordenunsi et al., 1985). Публиковани су и подаци о проучавању утицаја концентрације супстрата, концентрације квасца и додатка нутријената на принос етанола у процесу шаржне ферментације раствора глукозе (Chen, 1981). Поступак одзивне површине је примењен и за оптимизацију услова симултане сахарификације и ферментације са циљем добијања етанола из кухињског отпада (Wang et al., 2008). Испитана је и производња етанола из сока стабљике кинеске шећерне трске и примењена иста метода за испитивање утицаја садржаја азота, садржаја фосфора и вредности рН хранљиве подлоге на принос етанола (Yu et al., 2009).

3.2.3. Издајање и пречишћавање етанола

Проферментисана подлога је уобичајено водени раствор који садржи око 5-12% етанола. Издајање етанола из ове смеше је енергетски захтевна операција (Huang et al., 2009). Поред етанола у проферментисаној течности се налазе и бројне неиспарљиве и испарљиве примесе чији садржај зависи од производног микроорганизама, примењене сировине, начина вођења алкохолне ферментације и различитих хемијских и биохемијских процеса који се при томе одвијају. Операцијом дестилације у дестилат прелазе испарљиви састојци које чине алкохоли (етанол, нижи, виши и вишевалентни алкохоли), алдехиди, естри и киселине, а од начина дестилације у великој мери зависи њихова количина у сировом етанолу, односно његов квалитет. Остатак проферментисане подлоге у казану после дестилације се назива џибра, садржи 4,0-9,5% суве материје и успешно се примењује у исхрани стоке због високог садржаја протеина.

Сирови етанол се може користи у техничке сврхе или даље пречишћавати ректификацијом са циљем добијања рафинисаног етанола. Ректификација је процес вишестепене дестилације којом се постиже концентровање и рафинација етанола до најмање 95%. Примесе које се издајају треба да буду максимално концентроване, а губици етанола са споредним производима ректификације треба да буду сведени на минимум. Испарљивост примеса зависи од концентрације етанола у воденом раствору из којег се издајају примесе. Ако је концентрација примеса мала, може се претпоставити да испарљивост појединих примеса зависи и од присуства других примеса у раствору.

За примену етанола као горива захтева се производња апсолутног етанола. За дехидратацију етанола није могуће користити класичну дестилацију, јер етанол са водом гради азеотропну смешу при концентрацији етанола од 95,5% v/v. Поступци добијања анхидрованог етанола могу се поделити у четири основне групе (Заварго и сар, 2008):

- дестилациони поступци (азеотропна и екстрактивна дестилација),
- адсорпциона дехидратација (молекулска сита),
- мембрански поступци (первапорација/периспаривање) и
- хибридни поступци (комбиновани процеси дестилације и периспаривања).

Дестилациони поступци, било азеотропна или екстрактивна дестилација, најзаступљенији су индустријски поступци анхидровања етанола, иако су економски најнеповољнији. Адсорпциона дехидратација се заснива на коришћењу дехидратационих средстава за издајање воде из рафинисаног етанола (95-96% v/v), а најчешће се у ове сврхе користе молекулска сита чије су поре пермеабилне за воду, али не и за етанол (www.BestEnergy.com). Молекулска сита могу бити синтетички или природни зеолити, калијум-алуминосиликатног састава или одређени полимерни материјали (Ullman's encyclopedia, 2003). Овај поступак добијања апсолутног етанола услед своје једноставности и нижих трошкова све чешће замењује дестилационе поступке у индустријској пракси. Мембрански поступак, односно анхидровање етанола применом периспаривања, је поступак у развоју, али са изузетно ниским трошковима па се стога очекивати да ће у будућности потпуно елиминисати друге методе. Ипак тренутно су најперспективнији такозвани хибридни поступци који комбинују дестилационе и мембранске поступке (Заварго и сар, 2008).

3.2.4. Квалитет и примена етанола

Према Закону о етанолу, који важи на територији Србије, а објављен је у "Службеном гласнику РС", бр.41/2009 од 02.06.2009. године, етанол може бити:

1. сирови етанол алкохолне јачине до 88% v/v;
2. технички етанол алкохолне јачине од 88 до 96% v/v;
3. рафинисани етанол алкохолне јачине од 96 до 99% v/v;
4. апсолутни етанол алкохолне јачине од 99 до 99,99% v/v.

Сирови етанол добијен ферментацијом подлоге на бази меласе, има непријатан приукус и мирис услед присуства једињења са азотом и естара бутерне киселине. Примесе се могу образовати током дестилације услед реакције органских киселина из проферментисане подлоге са материјалима од којих су направљене дестилационе колоне. Сирови етанол се контролише прописаним стандардом. До усвајања новог Правилника о квалитету етанола, од којег се очекује да буде у потпуности усклађен са Законом о етанолу, у Србији се примењује ЈУС Е.М3.020, Правилник број 07-3405-1, Службени лист СФРЈ број 47/85.

Стандардом СРПС Х.Г3.101:1966 који прописује квалитет чистих хемикалија су дефинисане карактеристике апсолутног етанола. Овим прописом се утврђују три категорије квалитета („pro analysi“, „purissimum“ и „purum“) у зависности од граничних вредности садржаја примеса, запреминске масе и спољног изгледа апсолутног етанола. Апсолутни етанол се примењује као хемијски реагенс, органски растварач, сировина је за добијање многих важних хемикалија и међупроизвод добијања лекова, пластике, лакова, пластификатора и козметичких средстава. Такође се примењује за производњу биодизела, у електронској и војној индустрији. Апсолутни етанол се сматра одличном заменом за бензин због становушта да је сагоревање горива из обновљивих извора безбедно по животну средину у смислу емисије гасова стаклене баште. Према литературним подацима, концентрација етанола који се примењује за мешање са бензином треба да износи 99,35% v/v како би се избегао проблем сепарације фаза током складиштења, дистрибуције и примене. Да би примена етанола као замене за бензин била ефективна, утрошак енергије за производњу апсолутног етанола мора бити мањи од количине енергије која се добије из етанола (Kumar et al., 2010).

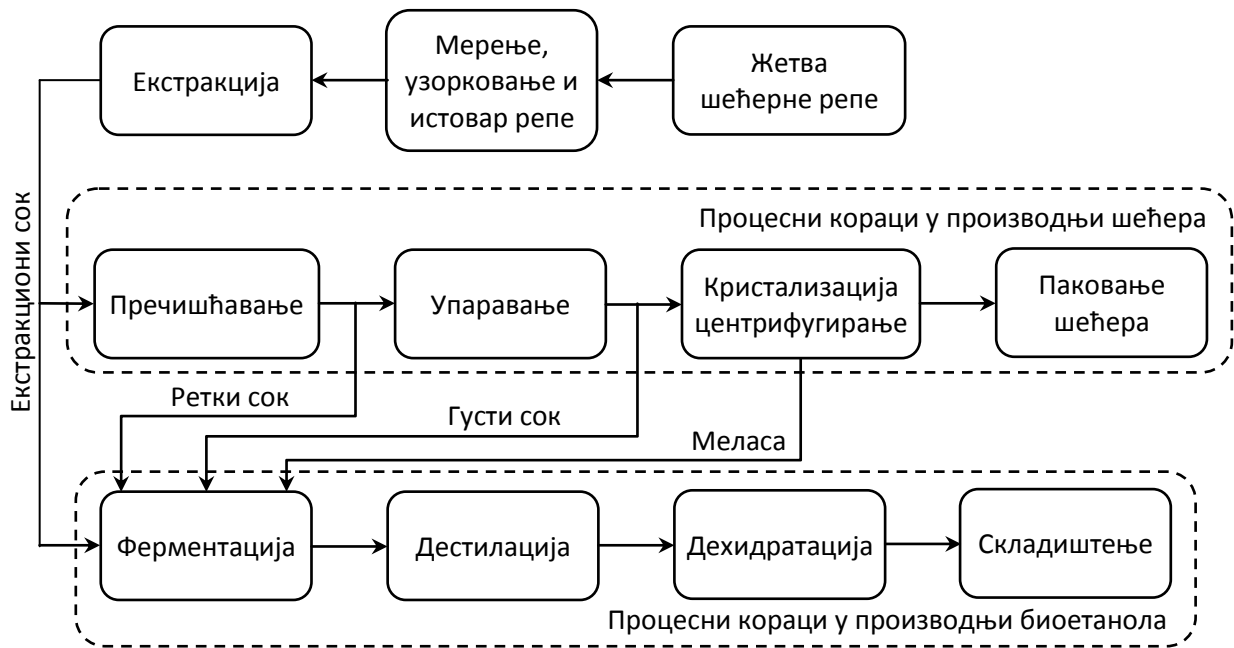
Табела 11: Показатељи квалитета етанола у међународном промету

Карактеристика	Категорија квалитета етанола									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
садржај етанола [%]	>85	>95	96	96	97	97	97	97	99,8	-100
изглед	безбојан и бистар									
мирис и укус	нечист		на сировину				неутралан			
пермаганатни тест [min]	-	-	-	-	20	30	30	30	30	-
садржај алдехида максимум [mg/l]	-	-	-	50	5	2	2	2	2	50
садржај виших алкохола максимум [mg/l]	-	-	30	5	2	2	2	2	30	2
садржај испарљивих киселина максимум [mg/l]	-	-	-	5	2	2	2	2	3	2
садржај естара максимум [mg/l]	-	-	-	50	5	у трагу		-	-	у трагу
садржај метанола максимум [mg/l]	-	-	-	-	-	500	100	10	-	10
испарљиви остатак максимум [mg/l]	-	-	-	15	10	15	8	8	-	-

У међународном промету етанол је према квалитету разврстан у десет категорија. Вредности показатеља квалитета које треба да задовољи етанол сваке категорије су наведене у Табели 11 (Лучић, 1987). У прву категорију сврстан је сирови непречишћен етанол, који је међупроизвод и даље се пречишћава и концентрише. У другу категорију је сврстан концентрисани непречишћен етанол, такође међупроизвод којем следи даље пречишћавање, али се може користити као сировина у хемијској индустрији. У трећу категорију се убраја концентрисан и слабо пречишћен етанол добијен из скробних сировина или као дестилат вина. Етанол ове категорије се примењује за производњу жестоких алкохолних пића и као конзерванс у прехранбеној индустрији или се даље прерађује. Четвртој категорији припада ректификовани етанол, који се примењује за производњу жестоких алкохолних пића попут вискија, благог рума, џина и житне водке, код којих је пожељно присуство благе ароме сировине као карактеристика пића. У категорије од пет до осам је сврстан ректификован, веома пречишћен етанол. Његова цена је висока, а примењује се у фармацеутске и козметичке сврхе, за производњу жестоких алкохолних пића у којима су трагови ароме непожељни, а често и за корекцију садржаја етанола у воћним винима. У девету категорију је сврстан безводни непречишћен етанол произведен континуалном вакуум дестилацијом бинарних и тернарних смеша (најчешће са бенzenом). Основна намена етанола овог квалитета је додаток горивима, производња ЕТБЕ (етил-терцијалног бутилестра) као замене за тетраетил-олово у горивима или примена у петрохемијској индустрији. Производња етанола управо овог квалитета је доживела највећу експанзију. У десету категорију је сврстан безводни, веома пречишћен етанол произведен из етанола осме категорије квалитета. Етанол највише категорије квалитета се примењује у медицинске сврхе и као растварач за есенције и боје (Мојовић и сар., 2007; Лучић, 1987).

3.2.5. Преглед могућности копроизводње шећера и етанола

Производња шећера, која обухвата прераду шећерне репе до белог шећера, сувих резанаца и меласе, је у целости оптимизована (Hempelmann, 2007). Увећање приноса и ефикасности производње етанола су довели до смањења потребних количина шећерне репе. Стога је већина постојећих шећерана у Европи отпочела копроизводњу етанола у додатно изграђеним рафинеријама (Porov et al., 2010). Концепт копроизводње шећера и етанола представља атрактивну опцију, будући да омогућава флексибилност у смислу варирања произведених количина шећера и етанола, у зависности од услова који владају на тржишту. Шема производње шећера и етанола из шећерне репе зависи од већег броја фактора као што су одабрани однос производње шећера и етанола, избор полазне сировине за производњу етанола (екстракциони сок, ретки сок, густо сок, меласа или шећер), цена сировине и производа итд. Предност индустријских постројења пројектованих за копроизводњу шећера и етанола се огледа у чињеници да су копроизводи или чак отпадни токови једне технологије (меласа или сокови) доступни на истом месту као сировине у другој технологији, нпр. технологији етанола. Производња етанола из шећерне репе је технички изводљива у већини шећерана, уз одговарајућу модификацију постројења и опреме, као и уз извесне додатке. Додатни процеси и операције, потребни за производњу етанола из шећерне репе, обухватају ферментацију, дестилацију, дехидратацију, складиштење, контролу квалитета и паковање. Блок шема производње шећера и/или етанола је приказана на Слици 4 и обухвата заједничке процесе и операције за технологије шећера и етанола, као и оне који су специфични за наведене две технологије (Krajinс and Glavič, 2009).



Слика 4: Блок шема производње шећера и/или етанола

Након припреме хранљиве подлоге са одговарајућом концентрацијом шећера и суве материје, из шећера се у процесу ферментације добија етанол помоћу квасаца као производних микроорганизама. Током ферментације ослобађа се значајна количина угљендиоксида и топлоте. Већина ослобођеног CO_2 се може складиштити и применити за добијање комерцијалних производа као што су суви лед, течни угљендиоксид за газирана пића, пенушава средства за сузбијање пожара, производи за филтрацију и други индустријски примењиви производи (Cornland et al., 2001). По завршетку ферментације, 15% квасца се издваја као споредни производ, а 85% се рецикулацијом враћа у ферментор. На тај начин се избегава нагомилавање квасца у ферментору, а штеди количина шећера потребна за раст биомасе. Након ферментације, следе операције издвајања и пречишћавања етанола до постизања квалитета за одређену намену (Krajinс and Glavič, 2009).

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

4.1. Припрема сировина и дефинисање услова ферментације

4.1.1. Производни микроорганизми и припрема инокулума

Пет различитих комерцијално доступних типова квасца *Saccharomyces cerevisiae* је примењено током истраживања из оквира овог рада:

- квасац за производњу јаких алкохолних пића у форми сувог квасца (ЈП), (Lallemand Inc., Rexdale, Онтарио, Канада),
- квасац за производњу вина у форми сувог квасца (В), (Lallemand Inc., Rexdale, Онтарио, Канада),
- квасац за производњу вина толерантан на повишен садржај етанола у форми сувог квасца (ВТ), (Lallemand Inc., Rexdale, Онтарио, Канада),
- пекарски квасац у форми сувог квасца (ПС), (Alltech, Сента, Србија) и
- пекарски квасац у форми свежег квасца (ПСВ), (Alltech, Сента, Србија).

Типови квасца примењени као суве форме су ради рехидратације и прилагођавања на услове околине, пре ферментације суспендовани у малој количини хранљиве подлоге под аеробним условима током 2 h (температура 30°C, брзина мешања 200 o/min) и након тога додати остатку подлоге. Пекарски квасац, примењен у форми свежег квасца, је такође суспендован у малој количини хранљиве подлоге, а након тога одмах примењен за инокулацију. Примењена је количина инокулума, која обезбеђује концентрацију ћелија квасца од око 10^8 cfu/ml у засејаној хранљивој подлози (приближно 3 g суве материје квасца по 1000 ml хранљиве подлоге).

4.1.2. Хранљиве подлоге

За припрему хранљивих подлога примењени су екстракциони сок, ретки сок, густи сок и меласа из процеса прераде шећерне репе у три домаће фабрике шећера: „Црвенка“ а.д, Црвенка (Ш1), „ТЕ-ТО“ а.д, Сента (Ш2) и „Šajkaška-Hellenic Sugar Industry“ а.д, Жабалъ (Ш3). Наведени супстрати су разблаживани дестилованом водом до постизања почетног садржаја шећера у опсегу 5-25% m/v, у зависности од огледа. Вредност рН хранљиве подлоге је коригована на $5,0 \pm 0,2$ додатком 10% v/v сумпорне киселине. Стерилизација припремљених хранљивих подлога је изведена у аутоклаву при температури од 121°C и притиску од 2,2 bar-а у трајању од 30 min.

4.1.3. Услови ферментације

Експерименти са циљем испитивања тока и оптимизације услова ферментације су изведени у лабораторијском биореактору (*Woulff*-ова боца) укупне запремине 2 l (радна запремина 1,5 l). Биореактор је опремљен враћем, наставком испуњеним стерилним парафинским уљем, који обезбеђује анаеробне услове, омогућава отпуштање насталог CO₂, а спречава контаминацију и губитке етанола испаравањем. Ферментација хранљиве подлоге у трајању од 48 h, укључујући и време потребно за суспендовање инокулума, је изведена шаржним поступком под анаеробним условима, при температури од 30°C и брзини мешања 200 o/min, која је обезбеђена постављањем биореактора на микробиолошку лабораторијску тресилицу у термостату.

Ферментације хранљиве подлоге, са циљем испитивања кинетике тока ферментације при дефинисаним оптималним условима, су изведене у увећаној размери у лабораторијском биореактору (Chemar AG, CH-8708, Mäannedorf, Switzerland) укупне запремине 14 l (радне запремине 10 l) при анаеробним условима и температури од 28°C (интерна регулација температуре). Брзина мешања од 150 o/min је обезбеђена мешањем помоћу две паралелно постављене *Rushton*-ове турбине и 4 одбојника. Време ферментације у дефинисаном трајању је мерено од момента инокулације хранљиве подлоге.

4.2. Аналитички поступци

4.2.1. Анализа квалитета сировина

Анализа примењених сировина је извршена у складу са уобичајеном праксом лабораторијске контроле процеса производње фабрика шећера.

Садржај суве материје примењених сировина одређен је рефрактометријски по методи 4.3 (Милић и сар., 1992).

Садржај сахарозе у сировинама је одређен полариметријски у складу са методом 5.3.1 (Милић и сар., 1992).

Квоцијент чистоће је изражен као проценат сахарозе у укупном садржају суве материје (Šušić i Guralj, 1965).

Вредност pH је мерена стакленом електродом помоћу лабораторијског мултипараметарског анализатора Consort C863 (Consort, Turnhout, Belgium).

Садржај пепела је израчунат на основу следеће формуле (Herlich, 1990):

$$\text{садржај пепела (\%)} = 0,0018 [a - (b \times 0,9)] \times 20$$

где је: a – проводљивост узорка ($\mu\text{S}/\text{cm}$) и
 b – проводљивост дестиловане воде ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

Проводљивост узорака и дестиловане воде је измерена помоћу кондуктометријске електроде лабораторијског мултипараметарског анализатора Consort C863 (Consort, Turnhout, Belgium).

Садржај редукујућих шећера је одређен методом са динитросалицилном киселином по *Miller*-у (1959) са глукозом као стандардом.

Садржај укупног азота у примењеним сировинама је одређиван методом по *Kjeldahl*-у (Standard Methods for Examination of Water and Waste Water, 1998).

4.2.2. Анализа узорака ферментационе течности

Узорци култивационе течности су ради потребних анализа узимани у стерилним условима у дефинисаним временским интервалима.

Број ћелија квасца у ферментационој течности је одређиван бројањем у *Neubauer*-овим коморама при увећању 400 пута уз примену оптичког микроскопа (*Wild M20, Heerbrugg, Gais, Switzerland*). Вијабилност ћелија је потврђена техником бојења са метиленско-плавим (*McDonald, 1963*).

Садржај биомасе у култивационој течности (g/ml) је одређиван спекрофотометријски помоћу претходно дефинисане зависности апсорбанце у функцији суве материје модел раствора познатог садржаја биомасе квасца. Сува материја модел раствора одређена је сушењем талога који је издвојен центрифугирањем 10 ml суспензије у току 10 min на 3000 o/min (*Tehtnica LC-321, Železniki*), на 105°C до констатне масе. Апсорбанца модел раствора је мерена спекрофотометром (*UV Spectrophotometer, UV-1800, Shimadzu, Japan*) на 660 nm (*Govindaswamy and Vane, 2007*), чиме су добијене њене зависности од суве материје модел раствора познатог садржаја биомасе квасца. Мерењем апсорбанци узорака култивационе течности на истој таласној дужини и интерполацијом измерених вредности у претходно дефинисану функцију индиректно су добијени подаци о садржају биомасе.

Садржај суве материје узорака (CM) је одређиван гравиметријски сушењем на 105°C до постизања константне масе (*Herlich, 1990*).

Узорци ферментационих течности су центрифугирани при 4000 o/min у трајању од 15 min. Након тога је садржај сахарозе и редукујућих шећера (сума глукозе и фруктозе) одређиван у супернатанту (*Jasco, Inc, Easton, MD, USA*, пумпа PU-980, детектор RI-930, узоркивач AS-950, 20 µl инјекциона петља, колона KS-801, елуент: вода са протком од 0,6 ml/min, време елуције 30 min). Укупан садржај шећера је изражен као збир садржаја сахарозе и редукујућих шећера.

Садржај укупног азота у ферментационим течностима је одређиван методом по *Kjeldahl*-y (*Standard Methods for Examination of Water and Waste Water, 1998*).

Укупан садржај растворених соли (TDS, енгл. total dissolved solids) је одређен мерењем помоћу кондуктометријске електроде, а вредност pH је мерена стакленом електродом помоћу лабораторијског мултипараметарског анализатора *Consort C863* (*Consort, Turnhout, Belgium*).

Садржај етанола је одређиван директно у узорцима култивационе течности гасном хроматографијом, применом уређаја HP 5890 Series II GC (*Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA*) опремљеног пламено-јонизујућим детектором и колоном *Carbowax 20 M*, при 85°C и са хелијумом као гасом носачем. Температура инјектора и детектора је одржавана на 150°C.

4.2.3. Статистичка обрада података

Сви резултати приказани у овом раду представљају средње вредности из три експеримента поновљена под истим условима. Резултати су статистички обрађени анализом варијансе при степену значајности $\alpha=0,05$. Адекватност модела је процењена на основу коефицијента детерминације (R^2) и p -вредности модела. Метода одзивне површине функције је метода моделовања погодна за проучавање утицаја више фактора на одзиве њиховим истовременим варирањем уз извођење ограниченог броја експеримената.

За опис одзивне функције Y (број ћелија квасца (cfu/ml), садржај етанола (% v/v) и укупан садржај шећера (% m/v)), примењен је полином другог реда:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11}^2 X_1^2 + b_{22}^2 X_2^2 + b_{12} X_1 X_2$$

где је: b_0 - одсечак,
 b_1 и b_2 - линеарни коефицијенти,
 b_{11} и b_{22} - квадратни коефицијенти и
 b_{12} - коефицијент интеракције.

Испитиван је утицај следећих фактора у наведеним опсезима:

X_1 : почетни садржај шећера у култивационој течности (5-25% m/v) и

X_2 : трајање ферментације (0-48 h).

Статистичка обрада експерименталних података и цртање површина одзива је урађено применом софтверског пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA). Значајност утицаја сваког од фактора као и њихових интеракција одређивана је поређењем t -вредности за сваки од коефицијената у регресионој једначини. За оптимизацију фактора, примењена је метода жељене (тражене) функције у софтверском пакету DESIGN-EXPERT 7.1.5. (Design-Expert 7.1.5, пробна верзија, StatEase, Inc., USA).

4.2.4. Прорачун кинетичких параметара

Кинетика раста је описана помоћу *Monod*-ове једначине уз следеће претпоставке:

- мешање унутар биореактора је такво да су услови уједначени у његовој целокупној запремини, и
- брзина мешања од 150 o/min је више него довољна за добар пренос масе и униформну доступност супстрата.

Брзине производње биомасе (r_x), потрошње супстрата (r_s) и производње етанола (r_p) су израчунате дељењем функције "moving average" (Data Analysis ToolPak, Microsoft Office Excel 2007), за вредности количине биомасе, садржаја етанола и укупног садржаја шећера, респективно, од првог до трећег узорка од три узастопна узорковања, са временским интервалом који покрива ова три узорковања.

Коефицијент приноса етанола представља садржај етанола добијен по јединици утрошеног супстрата. Рачунат је применом следеће једначине:

$$Y_{p/s} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S} \cdot 100 \quad (16)$$

где је: $Y_{p/s}$ – коефицијент приноса етанола (%),
 P_t – садржај етанола у моменту узорковања (g/l),
 P_0 – садржај етанола у моменту инокулације (g/l),
 S_0 – укупан садржај шећера у моменту инокулације (g/l), и
 S – укупан садржај шећера на крају ферментације (g/l).

Коефицијент приноса биомасе представља количину настале биомасе по јединици утрошеног супстрата. Рачунат је применом следеће једначине:

$$Y_{x/s} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S} \quad (17)$$

где је: $Y_{x/s}$ – коефицијент приноса биомасе (g/g),
 X_t – садржај биомасе у моменту узорковања (g/l),
 X_0 – садржај биомасе у моменту инокулације (g/l),
 S_0 – укупан садржај шећера у моменту инокулације (g/l), и
 S – укупан садржај шећера на крају ферментације (g/l).

Степен конверзије супстрата представља количину утрошеног супстрата у односу на почетну количину супстрата. Рачунат је на основу следеће једначине (Додић и Попов, 2009):

$$K = \frac{S_0 - S_t}{S_0} \cdot 100 \quad (18)$$

где је: K – степен конверзије супстрата (%),
 S_0 – укупан садржај шећера у моменту инокулације (g/l), и
 S_t – укупан садржај шећера у времену узорковања (g/l).

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У првом делу овог поглавља су приказани резултати анализе састава међупроизвода технологије прераде шећерне репе из три домаће фабрике шећера, који су примењени као сировине током истраживања из оквира овог рада. У другом поглављу су приказана истраживања са циљем утврђивања оптималног соја квасца *Saccharomyces cerevisiae* међу одабраним комерцијално доступним сојевима/типovima квасца на нашем тржишту. У трећем делу су приказани резултати испитивања тока ферментације подлога на бази горепоменутих сировина. На основу показатеља тока ферментације, дефинисани су значајни фактори који су укључени у моделовање одабраних одзива: број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера. У четвртом поглављу су приказани резултати примене методе жељене функције у комбинацији са полиномским зависностима посматраних одзива за оптимизацију почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Пето поглавље је посвећено провери валидности добијених резултата, односно њихове примењивости у увећаним размерама, као и утврђивању кинетике раста производног микроорганизма, кинетике потрошње лимитирајућег супстрата и кинетике добијања етанола као жељеног производа у процесу ферментације екстракционог, ретког и густог сока и меласе, при претходно дефинисаним оптималним условима.

5.1. Састав сировина

Састав међупроизвода прераде шећерне репе зависи од локалитета и врсте земљишта на којем се ова култура гаји, као и од примењеног технолошког поступка (van der Poel et al., 1998). Стога се јавила потреба за оптимизацијом добијања етанола ферментацијом екстракционог, ретког и густог сока, који се добијају у домаћим фабрикама шећера. Током истраживања из оквира овог рада, за припрему хранљивих подлога за ферментацију, примењивани су међупроизводи прераде шећерне репе из три домаће фабрике: „Црвенка“ а.д, Црвенка (Ш1), „ТЕ-ТО“ а.д, Сента (Ш2) и „Šajkaška-Hellenic Sugar Industry“ а.д, Жабал (Ш3). Резултати анализе састава екстракционог, ретког и густог сока, као и меласе, су приказани у Табелама 12, 13, 14 и 15, респективно.

Табела 12: Састав екстракционог сока

Екстракциони сок	Ш1	Ш2	Ш3
Сува материја (% m/m)	14,56	15,46	13,44
Сахароза (% m/m)	12,94	13,63	11,00
Квоцијент чистоће (%)	88,87	88,16	81,84
pH (1)	6,41	6,38	5,78
Пепео (% m/m)	0,281	0,469	0,212
Редукујући шећери (% m/m)	0,069	0,068	0,053
Укупан азот (% m/m)	0,129	0,105	0,104

Према литературним наводима садржај суве материје у екстракционом соку у просеку износи 15-20%, а садржај сахарозе је 13,5-19,5% (van der Poel et al., 1998). Коришћени екстракциони сокови имају нешто нижи садржај суве материје и значајно нижи садржај сахарозе него што је уобичајено у светским размерама. Овакав састав екстракционих сокова из домаћих шећерана у великој мери је последица лошег квалитета шећерне репе. Лош квалитет ове пољопривредне културе узрокован је неадекватном применом агротехничких мера у протеклих неколико деценија што за последицу има значајну деградацију квалитета земљишта. Екстракциони сок из једне од шећерана (Ш3) има значајно мањи садржај суве материје и сахарозе у односу на екстракционе сокове друге две шећеране (Ш1 и Ш2) услед лошијег квалитета шећерне репе коју ова шећерана прерађује. Из тог разлога се у жабаљској шећерани примењује значајно већа количина воде при екстракцији шећера из резанаца шећерне репе. Уобичајен опсег у којем се креће квоцијент чистоће екстракционог сока је 85-90% (Hinková and Bubník, 2001). Нижа вредност квоцијента чистоће екстракционог сока жабаљске шећеране указује на низак садржај сахарозе у сировини која је прерађивана у овој фабрици. Вредност рН сва три примењена екстракциона сока налази се у оквиру уобичајеног опсега 5,5-6,5 који наводи литература (Hinková and Bubník, 2001). Пепео представља неоргански део узорка који остаје после спаљивања органских конституената смеше. Обично садржи оксиде или сулфате калијума, натријума, калцијума и магнезијума док присуство амонијум-јона није доказано. Он такође садржи фосфатне анјоне у облику фосфат(V)-оксида и сулфатне анјоне у облику сумпор(III)-оксида, као и хлоридне и карбонатне анјоне (van der Poel et al., 1998). Резултати приказани у Табели 12 показују да је садржај пепела у сва три примењена екстракциона сока у оквиру уобичајених вредности које износе 0,2-0,5%. Екстракциони сок из једне шећеране (Ш2) има готово двоструко већи садржај кондуктометријски одређеног пепела у односу на екстракционе сокове преостале две шећеране (Ш1 и Ш3) што указује на већи садржај минералних материја, које у највећем делу чине оксиди калијума и натријума (Шушић и сар., 1994). У коришћеним узорцима екстракционог сока садржај редукујућих шећера и укупног азота је уобичајен за наше поднебље.

Табела 13: Састав ретког сока

Ретки сок	Ш1	Ш2	Ш3
Сува материја (% m/m)	14,37	14,11	12,23
Сахароза (% m/m)	13,07	12,79	11,20
Квоцијент чистоће (%)	90,95	90,64	91,58
рН (1)	9,09	8,91	9,07
Пепео (% m/m)	0,338	0,337	0,287
Редукујући шећери (% m/m)	0,013	0,013	0,011
Укупан азот (% m/m)	0,128	0,102	0,098

Ретки сок се добија из екстракционог сока чишћењем, које подразумева издвајање суспендованих грубих нерастворних нечистоћа и веће количине кохидно и јонски растворених нешећера. Уобичајене вредности садржаја суве материје ретког сока се налазе у опсегу 10-15% (Шушић и сар., 1994). Садржај суве материје ретког сока шећеране Ш3 је значајно нижи у односу на исти ефлуент Ш1 и Ш2 фабрике шећера. Међутим, састав коришћених ретких сокова у погледу садржаја суве материје не одступа од уобичајеног, који се налази у опсегу 12-14% (Krajnc and Glavič, 2009). Ретки сок Ш3 шећеране садржи и мању количину сахарозе од уобичајене што је очекивано с обзиром на састав екстракционог сока исте шећеране. Међутим, висок квоцијент чистоће овог ретког сока указује на ефикасност технолошког поступка чишћења екстракционог сока у овој шећерани која шећерана има посебно развијен поступак прераде шећерне репе лошег квалитета, познат као Новосадски поступак. Овај поступак се одликује изузетно ефикасним чишћењем екстракционог сока. У току чишћења сока врши се алкализација тако да уобичајена

вредност рН ретког сока износи 9,0-9,5 (Шушић и сар., 1994). Резултати приказани у Табели 13 показују да су вредности рН ретких сокова црвеначке и жабаљске шећеране у оквиру уобичајених вредности док исти ефлуент сенћанске шећеране има нешто нижу вредност. У погледу садржаја пепела нема значајних разлика између испитаних екстракционих и ретких сокова док је садржај укупног азота нешто нижи у ретким соковима што је последица денатурације и таложења дела протеина током фазе чишћења (Шушић и сар., 1994).

Табела 14: Састав густог сока

Густи сок	Ш1	Ш2	Ш3
Сува материја (% m/m)	60,31	68,93	62,61
Сахароза (% m/m)	54,12	61,32	56,20
Квоцијент чистоће (%)	89,74	88,96	89,76
рН (1)	8,03	8,13	8,75
Пепео (% m/m)	1,97	2,37	1,94
Редукујући шећери (% m/m)	0,501	0,324	0,502
Укупан азот (% m/m)	0,158	0,193	0,156

Густи сок се добија вишестепеним упаравањем ретког сока до постизања садржаја суве материје од око 65-70% (Крајнс and Glavič, 2009). Према литературним подацима садржај сахарозе у густом соку просечно износи 55-65% (Hinkova and Bubnik, 2006). На основу резултата приказаних у Табели 14 уочава се да једино густи сок шећеране Ш2 има уобичајен садржај суве материје док испитани густи сокови друге две шећеране (Ш1 и Ш3) имају значајно нижу вредност садржаја суве материје. У погледу састава сахарозе, густи сок шећеране Ш1 одступа од уобичајене вредности у светским размерама. Током упаравања не долази до значајних промена у погледу састава сока, изузев губитка воде, услед чега се квоцијенти чистоће ретког и густог сока врло мало разликују (Шушић и сар., 1994). Током упаравања дешавају се и извесне хемијске промене које се огледају у смањењу алкалности сока. Вредности рН густих сокова су ниже у односу на ретке сокове што је у складу са очекивањима. Наравно, за постизање уједначених вредности садржаја сахарозе и суве материје, у шећерани Ш3 је морала бити утрошена већа количина енергије.

Табела 15: Састав меласе

Меласа	Ш1	Ш2	Ш3
Сува материја (% m/m)	81,32	81,12	83,50
Сахароза (% m/m)	50,14	48,96	51,10
Квоцијент чистоће (%)	61,66	60,35	61,20
рН (1)	7,05	7,17	6,66
Пепео (% m/m)	9,92	9,85	10,12
Редукујући шећери (% m/m)	0,862	0,804	0,891
Укупан азот (% m/m)	1,841	1,893	1,865

Уобичајен састав меласе чини око 50% сахарозе, око 30% нешећера и око 20% воде. Међутим, хемијски састав меласе је сложен јер се у њој налази преко 200 различитих органских и неорганских једињења, али је само ограничен број од значаја за производњу шећера и етанола. У зависности од квалитета шећерне репе и примењене технологије прераде садржај компонената меласе варира у следећем опсегу (%): сува материја 74-84, сахароза 46-52, укупан азот 1,4-2,1 и пепео 6-11 (Шушић и сар., 1994). Садржај наведених састојака све три примењене меласе се креће у уобичајеном опсегу. Просечан састав редукујућих материја у меласи износи 1,0-2,5% (van der

Poel et al., 1998). Будући да већи део редукујућих материја меласе чине редукујући шећери утврђени садржај у меласама из домаћих фабрика је очекиван (Табела 15). Вредност рН меласе се обично налази у опсегу 7,2-8,9 (Пејин, 1989). На основу резултата приказаних у Табели 15 вредности рН испитаних меласа се налазе у неутралној до слабо киселој области што је ређе последица технолошког поступка, а метаболичке активност контаминирајућих микроорганизама (Пејин, 1989).

Резултати анализе састава екстракционог, ретког и густог сока и меласе, указују да су наведени међу- односно нуспроизводи прераде шећерне репе уобичајеног састава за процес прераде у домаћим шећеранама. Наведени супстрати, на основу свог састава, представљају погодну сировину за припрему хранљиве подлоге за производњу етанола.

5.2. Одабир комерцијалног соја квасца

За индустријску производњу етанола, производни микроорганизам се бира на основу његових особина, као и карактеристика процеса и расположиве опреме (Roehr, 2001). Готово целокупна производња етанола, како у свету тако и у нашој земљи, се врши употребом једне врсте квасца *Saccharomyces cerevisiae* (Mukhtar et al., 2010; Knauf and Kraus, 2006). Поједине фабрике у нашој земљи у производњи етанола полазе од чисте културе производног микроорганизма док већина за припрему инокулума примењује комерцијално доступне сојеве квасца. У новије време неке домаће фабрике етанола као производни микроорганизам користе „отпадни“ пивски квасац због његове ниске цене, али и због велике метаболичке активности при ниским температурама. У индустрији етанола се тежи постизању високих концентрација овог производа метаболизма квасца у ферментисаној подлози због значајне уштеде енергије која се на тај начин остварује током његовог издвајања и пречишћавања, као и током третмана отпадне џибре (Bai et al., 2008). Испитивања физиологије квасца указују да многи сојеви *Saccharomyces cerevisiae* толеришу веће концентрације етанола него што се раније веровало, и то без посебне припреме или примене генетских модификација (Thomas and Ingledew, 1992).

Циљ истраживања из оквира овог поглавља је утврђивање утицаја примењеног соја квасца на састав проферментисаних подлога на основу којег ће се статистичком анализом извршити избор соја међу одабраним комерцијалним сојевима/типovima квасца доступним на нашем тржишту. Примењени сојеви квасца представљају starter културе за различите гране прехранбене индустрије. Квасац за производњу јаких алкохолних пића и етанола је примењен у форми сувог квасца (ЈП). Одлика овог соја је толерантност на висок садржај шећера, али и етанола у ферментисаној подлози по спецификацији произвођача Lallemand Inc., Rexdale, Онтарио, Канада. Примењена су и два соја квасца намењена првенствено за производњу вина (В и ВТ), чије одлике су по спецификацији произвођача (Lallemand Inc., Rexdale, Онтарио, Канада) веома кратка *lag*-фазе и брза ферментације, оба у форми сувог квасца. Додатна карактеристика соја ВТ је толерантност на високе концентрације етанола. Исти сој комерцијалног пекарског квасца је примењен у две форме, као суви (ПС) и свежи квасац (ПСВ), произвођача Alltech, Сента, Србија.

Будући да наставак истраживања обухвата детаљно испитивање тока ферментације подлога на бази екстракционог, ретког и густог сока као међупроизвода и меласе као нуспроизвода технологије прераде шећерне репе, у оквиру овог поглавља извршене су по три одвојене ферментације сваког од наведена четири супстрата помоћу пет различитих starter култура квасца са циљем одабира адекватног соја. Да би се омогућила упоредна анализа добијених резултата, хранљиве подлоге на бази наведених супстрата припремљени су тако да имају исти почетни садржај шећера. Будући да садржај шећера у екстракционом и ретком соку износи максимално $\approx 13\%$ *m/v*, ови супстрати су примењени без разблажења док су густо сок и меласа разблажени дестилованом водом до истог почетног садржаја шећера. Ток сваке ферментације је испраћен анализом показатеља тока, који су уобичајени у биотехнолошким процесима, и ови резултати су приказани у Прилогу 1.

У складу са дефинисаним циљем овог поглавља, вредности испитаних показатеља по истеку 48 h ферментације, су статистички обрађене анализом варијансе и аритметичке средине су упоређене *Scheffe*-овим тестом при нивоу значајности $p=0,05$. Ови резултати, приказани у Табели 16, су изражени као интервалне процене у облику:

$$x = \bar{x} \pm 3 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (19)$$

где је: \bar{x} - аритметичка средина,
 σ - стандарна девијација, и
 n - број поновљених мерења.

Табела 16: Утицај примењеног типа квасца *Saccharomyces cerevisiae* на састав проферментисане течности након 48 h трајања ферментације

Показатељ тока ферментације	Тип квасца <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
	ЈП	В	ВТ	ПС	ПСВ
Број ћелија квасца (*10 ⁻⁸ cfu/ml)	2,185±0,116a	2,173±0,078a	2,028±0,123a	2,175±0,147a	2,177±0,130a
Укупан садржај шећера (% v/v)	0,170±0,019a	0,226±0,037a	0,178±0,024a	0,185±0,024a	0,153±0,017a
Садржај укупног азота (% m/v)	0,154±0,094a	0,159±0,091a	0,157±0,091a	0,154±0,093a	0,144±0,099a
TDS (g/l)	3,939±1,677a	3,898±1,622a	3,876±1,629a	3,939±1,677a	3,909±1,674a
pH (1)	4,115±0,301a	4,309±0,022a	4,259±0,235a	4,240±0,229a	4,341±0,218a
Садржај етанола (% v/v)	8,048±0,100a	7,983±0,324a	8,063±0,239a	7,808±0,249a	7,830±0,254a

Свака вредност представља аритметичку средину 36 вредности (4 хранљиве подлоге × 3 шећеране × 3 понављања). Имеђу вредности приказаних у истом реду уз које стоји исто слово нема статистички значајних разлика ($p < 0,05$).

ЈП – суви квасац за производњу јаких алкохолних пића и етанола
В и ВТ – суви квасац намењен производњи вина
ПС и ПСВ – суви и свежи квасац намењен пекарској производњи

На основу приказаних резултата нема статистички значајне разлике у погледу састава ферментисаних поглога добијених метаболичком активношћу различитих сојева/типова квасца под примењеним експерименталним условима. У случају примене свежег квасца нема потребе за рехидратацијом, а захтеви у погледу прилагођавање ћелија производног микроорганизма условима средине су минимални (Knauf and Kraus, 2006). Узимајући у обзир добијене резултате и једноставност примене свежег формованог квасца, испитани сој комерцијалног пекарског квасца у форми свежег квасца (ПСВ) домаћег произвођача Alltech, Сента, Србија ће бити примењен у даљим истраживањима.

5.3. Испитивање тока ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе

Ток ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе је испитан са циљем утврђивања могућности производње етанола из ових сировина и дефинисања фактора који ће бити укључени у даље моделовање. Такође је испитан и ток ферментације меласе, као нуспроизвода технологије прераде шећерне репе, који се традиционално примењује за добијање етанола. Ток ферментације је испраћен анализом следећих показатеља: број ћелија квасца, укупан садржај шећера, садржај укупног азота, укупан садржај растворених соли (TDS), вредност рН и садржај етанола током 48 h трајања ферментације. Наведени фактори се уобичајено испитују са циљем праћења биотехнолошких процеса (Laoraiboon et al., 2009; Rivera et al., 2006).

Међупроизводи технологије прераде шећерне репе и меласа као нуспроизвод не захтевају никакав третман пре ферментације (Tian et al., 2009). Сахароза се разлаже на глукозу и фруктозу у почетној фази ферментације дејством ензима инвертазе, који се налази у периплазматичном простору између ћелијског зида и ћелијске мембране квасца. Пре подвргавања ферментацији међупроизвода прераде шећерне репе потребно је извршити само одговарајуће разблажење и корекцију вредности рН (Leiper et al., 2006). Захваљујући томе, са економске тачке гледишта и у поређењу са скробним и лигноцелулозним сировинама, шећерна репа и међупроизводи њене прераде представљају веома погодне сировине за производњу етанола (Hinková and Bubnik, 2001).

Концентрација супстрата је значајан фактор, који утиче на ток ферментације. Високе концентрације супстрата имају инхибиторно дејство на раст и добијање производа и могу да изазову поремећај метаболизма микроорганизама. До значајне инхибиције раста и синтезе производа метаболизма долази при концентрацијама шећера у опсегу 5-25% па је опсег почетног садржаја шећера у овом раду дефинисан у складу са овим литературним податком (Thatipamala et al., 1992; Ergun and Mutlu, 2000). Према томе, екстракциони и ретки сок су разблаживани до почетног садржаја шећера у култивационој течности 5 и 10% m/v, и примењени без разблаживања са максималним почетним садржајем шећера од $\approx 13\%$ m/v, док су густи сок и меласа разблаживани до постизања почетног садржаја шећера у култивационој течности 5, 10, 15, 20 и 25% m/v. Током испитивања тока ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе примењиван је пекарски квасац у форми свежег квасца (ПСВ), као тип квасца који је изабран на основу резултата ранијих истраживања и који се уобичајено примењује у фабрикама етанола у нашем региону ().

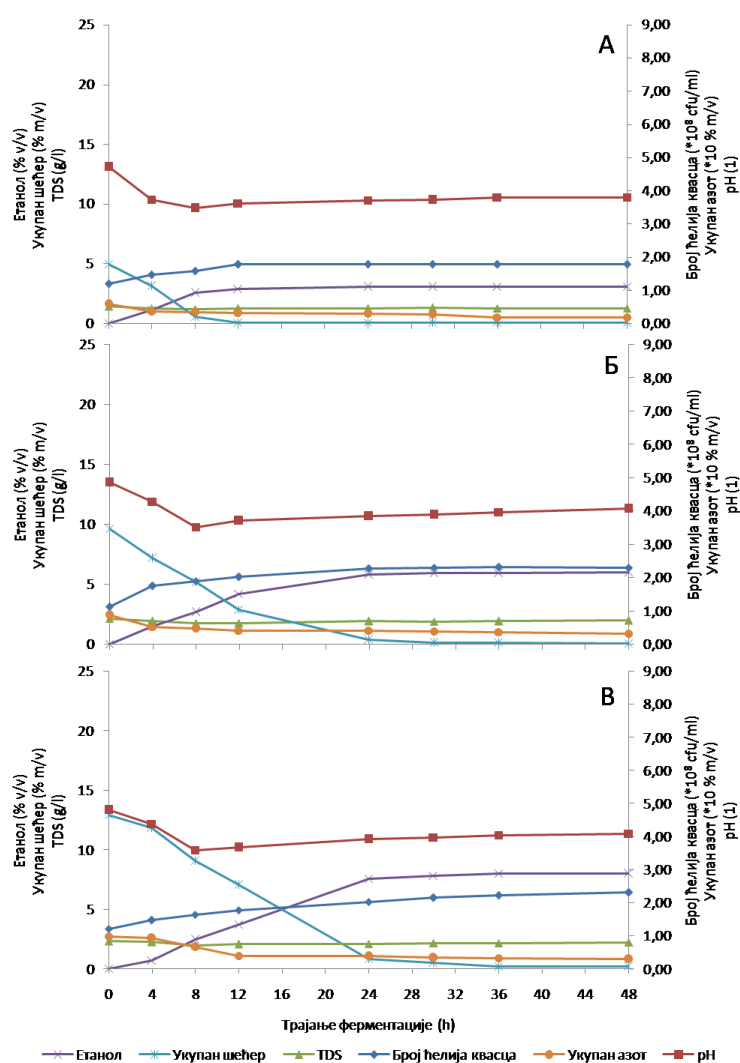
5.3.1. Испитивање тока ферментације екстракционог сока

На Слици 5 (А-В) је приказана промена броја ћелија квасца, укупног садржаја шећера, садржаја укупног азота, укупног садржаја растворених соли (TDS), вредности рН и садржаја етанола током ферментације хранљивих подлога на бази екстракционог сока са почетним садржајем шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v, респективно.

У току првих 12 h ферментације, односно у току интензивне метаболичке активности ћелија производног микроорганизама, уочено је формирање пене на површини ферментационе течности. У процесу прераде шећерне репе око 40% сапонина из репе прелази у екстракциони сок па у складу са тим садржај сапонина у екстракционом соку износи 0,08-0,16 g/100g суве материје (van der Poel et al., 1998). Може се претпоставити да је управо садржај сапонина узрок формирању густе пене током ферментације екстракционог сока. Уочено пењење није истог интензитета за све примењене сокове што указује на различит садржај сапонина и других пенушаваца у њима. Очигледно је да у погледу садржаја сапонина и других нечистоћа које изазивају пењење постоји разлика у саставу примењених екстракционих сокова, која је последица разлика у примењеној сировини односно шећерној репи и/или у примењеном технолошком поступку њене прераде

(Шушић и сар, 1994). Уочена појава је значајна из угла вођења биотехнолошког процеса будући да је формирање пене проблем који изискује дозирање антипенушавца, који након издвајања етанола, заостаје у отпадној цибри и у извесној мери повећава њено загађење (Ranković et al., 2009).

У току *lag* фазе, раст ћелија квасца није уочљив јер је метаболизам ћелија усмерен ка синтези рибозома и ензима, односно ка припремама за деобу (Bellisimi and Ingledew, 2005). На основу резултата приказаних на Слици 5 се може запазити готово линеаран пораст биомасе до 12 h ферментације, када број ћелија квасца износи $1,78 \times 10^8$, $2,02 \times 10^8$ и $1,77 \times 10^8$ cfu/ml у култивационим течностима са почетним садржајем шећера 5, 10 и 13% m/v, респективно. Ова чињеница указује да је *lag* фаза у току ферментације хранљивих подлога на бази екстракционог сока трајала занемарљиво кратко што је у складу са очекивањима будући да је као производни микроорганизам примењен пекарски квасац у форми свежег квасца (ПСВ), који има минималне захтеве у погледу рехидратације и прилагођавања условима средине и значајно краћу *lag* фазу у односу на друге форме квасца (Knauf and Kraus, 2006). Након 12 h број ћелија квасца се није значајно мењао, односно у ферментационом медијуму са почетним садржајем шећера од 5% m/v број ћелија квасца је осциловао око исте вредности док је у култивационим течностима са почетним садржајем шећера 10 и 13% m/v запажен веома благи пораст биомасе до 24 h ферментације након чега је уследила стационарна фаза раста (Popov et al., 2010).



Слика 5: Ток ферментације хранљивих подлога на бази екстракционог сока са почетним садржајем шећера (А) 5% m/v, (Б) 10% m/v и (В) 13% m/v

Раст ћелија квасца и продукција етанола су повезани феномени, односно ћелије квасца у експоненцијалној фази раста продукују етанол 33 пута брже у односу на ћелије које се налазе у стационарној фази раста (Kirshor, 1982). Добијени резултати иду у прилог овој тврдњи будући да се садржај етанола у ферментационим течностима са свим примењеним почетним садржајем шећера значајно повећао управо у периоду интензивног пораста броја ћелија квасца (Слика 5). У 12 h ферментације садржај етанола је износио 2,91, 4,21 и 3,72% m/v у култивационим течностима на бази екстракционог сока са почетним садржајем шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v, респективно. У ферментационој течности са почетним садржајем шећера 5% m/v, садржај етанола се у даљем току ферментације незнатно променио што је у складу са чињеницама да се у том периоду производни микроорганизам налазио у стационарној фази раста и да је преостали садржај укупног шећера био занемарљиво мали (Слика 5 (А)). У култивационом медијуму са почетном концентрацијом шећера 10% m/v, садржај етанола је до 24 h ферментације порастао на вредност 5,82% m/v, а у даљем току незнатно осиловао око наведене вредности. У ферментационој течности са почетним садржајем шећера $\approx 13\%$ m/v, готово линеаран пораст садржаја етанола је настављен до постизања вредности 7,57% m/v у 24 h, док је у даљем току ферментације забележен само благи пораст до коначне вредности од 7,95% m/v етанола (Popov et al., 2010).

Резултати приказани на Слици 5 указују да је смањење садржаја укупног шећера током ферментације значајно и да коиндицира са порастом биомасе и производњом етанола. У ферментационој течности на бази екстракционог сока са почетним садржајем шећера 5% m/v, садржај укупног шећера готово линеарно опада до 12 h ферментације када износи $\approx 0,1\%$ m/v (Слика 5 (А)). Занемарљиво мали садржај шећера је у корелацији са забележеном стаганацијом раста биомасе и продукције етанола у даљем току процеса. У ферментационим течностима са почетним садржајем шећера 10 и $\approx 13\%$ m/v, готово целокупна количина шећера се потроши до 24 и 30 h, када садржај укупног шећера износи 0,35 и 0,50% m/v, респективно (Слика 5 (Б, В)). Будући да је један од критеријума економичности процеса ферментације количина неискоришћеног шећера, која не би смела да износи више од 0,5% m/v (Bai et al., 2008), неопходно је размотрити дужину трајања ферментације подлога на бази екстракционог сока са техно-економског аспекта.

Асимилабилна једињења азота су значајне компоненте ферментационог медијума и доказано је да су лимитирајући нутријени у алкохолној ферментацији (Bai et al., 2008). Квасци могу да користе различите изворе неорганског и органског азота за инкорпорацију у структурна и функционална азотна једињења ћелије (Waker, 1997). Од азотних једињења, која квасац може да усваја, екстракциони сок садржи највише аминокиселина (Шушић и сар., 1994). Током експоненцијалне фазе раста је најизраженија потрошња азотних једињења из ферментационе течности услед уградње асимилованих азотних једињења у биомасу. На основу резултата приказаних на Слици 5, уочава се значајно смањење садржаја укупног азота током првих 12 h ферментације у све три ферментационе течности на бази екстракционог сока, што је и очекивано с обзиром на уочени пораст броја ћелија квасца у том периоду. У даљем току ферментације, садржај укупног азота је благо опадао тако да укупна промена садржаја укупног азота у култивационим течностима на бази екстракционог сока са почетном концентрацијом шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v износи 0,039, 0,055 и 0,069% m/v, респективно. По завршетку ферментације у свим течностима је остала извесна количина неискоришћеног азота (0,02-0,03% m/v). Очигледно је да екстракциони сок садржи довољну количину асимилабилног азота и да, под примењеним експерименталним условима, не постоји потреба за додатком овог нутријента приликом припреме хранљиве подлоге (Popov et al., 2010).

Оптимална вредност рН за производњу етанола се налази у опсегу 5,0-5,5 па је у складу са тим у свим огледима из оквира овог рада почетна вредност рН у хранљивим подлогама коригована на $5,0 \pm 0,2$. Квасци могу да расту и ефикасно производе етанол при вредностима рН у опсегу 3,5-6,0 (Roehr, 2001). Узимајући у обзир овај релативно широк опсег вредности рН, у току ферментације није вршена корекција овог параметра. Са Сликe 5 се може запазити значајан пад рН у току првих 8 h ферментације до вредности од око 3,7 у свим примењеним подлогама на бази екстракционог

сока. Добијени резултати су очекивани будући да до пада вредности рН долази услед продукције органских киселина, као споредних метаболита производног микроорганизма (Graves et al., 2006). У даљем току ферментације вредност рН је благо расла до вредности од око 4,0, која је достигнута након 48 h ферментације свих примењених подлога на бази екстракционог сока, што је у складу са резултатима других аутора (Leiper et al., 2006). Будући да се током укупног трајања ферментације вредност рН задржала у опсегу у којем је могућа ефикасна производња етанола, може се закључити да током ферментације подлога на бази екстракционог сока, под примењеним експерименталним условима, регулација вредности рН није неопходна (Pоров et al., 2010). Овакав закључак је у складу са резултатима других аутора, који указују да се алкохолна ферментација са и без регулације вредности рН не разликује значајно у смислу произведене количине етанола и раста биомасе (Turhan et al., 2010).

Укупан садржај растворених соли (TDS) током ферментације је значајан за метаболизам квасца. Садржај соли у шећерној репи зависи од великог броја фактора који се односе на услове гајења шећерне репе (локалитет, тир земљишта, климатски фактори итд.) (van der Poel et al., 1998), а око 70% соли садржаних у шећерној репи прелази у екстракциони сок (Шушић и сар., 1994). У хранљивим подлогама на бази екстракционог сока са почетном концентрацијом шећера 5, 10 и ≈13% m/v, садржај TDS-а износи 1,42, 2,14 и 2,30 g/l, респективно. Смањење садржаја TDS-а је најизраженије у току првих 12 h ферментације, односно у периоду највеће метаболичке активности производног микроорганизма. Промена садржаја TDS-а у наведеном временском интервалу износи око 0,2-0,4 g/l. У даљем току ферментације, садржај TDS-а се не мења значајно. На основу односа утрошеног и укупног садржаја TDS-а у подлогама на бази екстракционог сока, јасно је да овај међупроизвод технологије прераде шећерне репе садржи довољну количину растворених соли за потребе производног микроорганизма током алкохолне ферментације, под примењеним експерименталним условима.

Недостатак екстракционог сока, поред горенаведеног садржаја сапонина, је проблем његовог складиштења на дужи период услед састава који погодује развоју микроорганизама (Hinková et al., 2000). Стога се екстракциони сок мора директно применити за производњу етанола и/или шећера или упарити како би се могао чувати неколико месеци (Henke et al., 2006).

Експериментално је потврђена изводљивост добијања етанола ферментацијом екстракционог сока из домаћих фабрика шећера различитим сојевима квасца *Saccharomyces cerevisiae*. Припрема за ферментацију коју ова сировина захтева јесте корекција вредности рН и стерилизација (Pоров et al., 2010). Наведене карактеристике заједно са релативно ниском ценом у поређењу са другим међупроизводима прераде шећерне репе чине екстракциони сок веома исплативом сировином за производњу етанола (Hinková and Bubník, 2001).

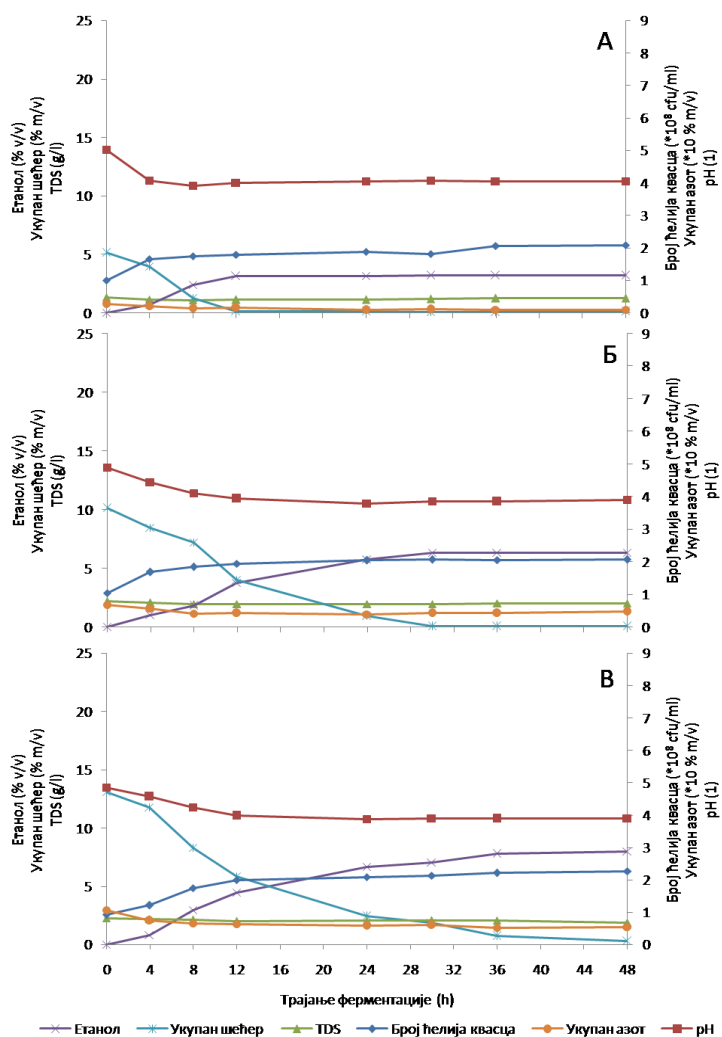
5.3.2. Испитивање тока ферментације ретког сока

На Слици 6 (А-В) приказана је промена броја ћелија квасца, укупног садржаја шећера, садржаја укупног азота, укупног садржаја растворених соли (TDS), вредности рН и садржаја етанола током ферментације хранљивих подлога на бази ретког сока са почетним садржајем шећера 5, 10 и ≈13% m/v, респективно.

Током ферментације подлога на бази ретког сока из све три испитиване шећеране, није запажено формирање постојане пене, за разлику од ферментације екстракционог сока. Ова појава је последица значајно мање количине присутних сапонина и других пенушаваца у ретком соку будући да се око 90% сапонина присутних у екстракционом соку уклони током чишћења (van der Poel et al., 1998).

На основу резултата приказаних на Слици 6, уочава се интензиван раст броја ћелија квасца до 12 h ферментације у култивационим течностима на бази ретког сока са почетним садржајем шећера 5, 10 и 13% m/v, до вредности $1,79 \times 10^8$, $1,94 \times 10^8$ и $2,00 \times 10^8$ cfu/ml, респективно. У даљем току процеса, број ћелија квасца се благо повећавао па је по истеку 48 h ферментације износио $2,08 \times 10^8$, $2,06 \times 10^8$ и $2,26 \times 10^8$ cfu/ml, у течностима са почетним садржајем шећера 5, 10 и 13% m/v, респективно. Добијени резултати указују на исти тренд пораста биомасе током ферментације подлога на бази екстракционог и ретког сока.

У складу са приказаним резултатима, који се односе на раст биомасе производног микроорганизама, током ферментације подлога на бази ретког сока, очекиван је значајан пораст садржаја етанола као примарног производа метаболизма током првих 12 h ферментације. Добијени резултати су складу са очекиваним будући да је у 12 h ферментације садржај етанола је износио 3,13, 3,78 и 4,47% m/v у култивационим течностима на бази ретког сока са почетним садржајем шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v, респективно. У ферментационом медијуму са почетном концентрацијом шећера 5% m/v, садржај етанола је стагнирао у даљем току ферментације као и садржај биомасе, што је очекивано будући да је до тада готово целокупан садржај шећера из хранљиве подлоге потрошен (Слика 6 (А)). У ферментационој течности са почетном концентрацијом шећера 10% m/v, забележен је пораст садржаја етанола до 30 h ферментације на вредност 6,33% m/v и осциловање око наведене вредности до завршетка процеса. У ферментационој течности са почетним садржајем шећера $\approx 13\%$ m/v, интензиван пораст садржаја етанола је трајао до постизања вредности 7,77% m/v у 24 h, а благи раст садржаја етанола је настављен до краја процеса када је постигнута вредност од 8,01% m/v етанола.



Слика 6: Ток ферментације хранљивих подлога на бази ретког сока са почетним садржајем шећера (А) 5% m/v, (Б) 10% m/v и (В) 13% m/v

У хранљивим подлогама на бази ретког сока, као и осталих међу- и нус-производа прераде шећерне репе, најзаступљенији извор угљеника је сахароза чије усвајање од стране квасца започиње екстерном ензимском хидролизом β -фруктофуранозидне везе молекула помоћу ензима инвертазе (Fugelsang i Edwards, 2007). Резултати анализе тока ферментације подлога на бази ретког сока указују да динамика опадања садржаја укупног шећера прати раст броја ћелија квасца и садржаја етанола (Слика 6). У ферментационој течности на бази ретког сока са почетним садржајем шећера 5% m/v, садржај укупног шећера готово линеарно опада до 12 h ферментације када износи $\approx 0,1\%$ m/v (Слика 6 (A)). Управо у овом временском интервалу је утврђено трајање експоненцијалне фазе раста производног микроорганизма и интензивна продукција етанола (Govindaswamy and Vane, 2007), а стаганација броја ћелија квасца и садржаја етанола у даљем току процеса су последица исцрпљивања извора угљеника. У ферментационој течности са почетним садржајем шећера 10 m/v, готово целокупна количина шећера се потроши до 30 h (Слика 5 (B)). У медијуму са почетним садржајем шећера $\approx 13\%$, садржај укупног шећера интензивно опада до 24 h ферментације, а након тога се лагано опада до краја процеса. Заправо, између 36 и 48 h ферментације садржај укупног шећера у наведеној подлози опада са вредности 0,71 на 0,28% m/v, што указује да се оптимална дужина трајања ферментације са становишта потрошње шећера налази у овом интервалу (Bai et al., 2008).

У току чишћења екстракционог сока, поред осталих нешећерних компоненти, уклања се део протеина док се преостали протеини разлаже до аминокиселина. Такође, у току чишћења сока, аминокиселине се трансформишу у друга једињења, а један део се одстрањује адсорпцијом (Шушић и сар., 1994). Међутим, резултати анализе састава екстракционог и ретког сока из три домаће шећеране (Табеле 14 и 15) указују да се ова два међупроизвода технологије прераде шећерне репе врло мало разликују у погледу садржаја укупног азота. На основу резултата приказаних на Слици 6 може се закључити да је потрошња азотних једињења из ферментационих течности на бази ретког сока изражена у првих 12 h процеса, односно управо током експоненцијалне фазе раста услед уградње једињења азота у биомасу. У даљем току ферментације, садржај укупног азота се благо смањивао. Укупна промена садржаја укупног азота у култивационим течностима на бази ретког сока са почетном концентрацијом шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v износи 0,017, 0,021 и 0,053% m/v, респективно. По завршетку процеса, у течностима са свим примењеним почетним садржајима шећера је остала извесна количина укупног азота (0,01-0,06% m/v) што указује да ретки сок садржи довољну количину овог нутријента за потребе производног микроорганизма током алкохолне ферментације.

Да би се постигле високе концентрације етанола потребно је уклонити факторе који изазивају стрес ћелија квасца *S. cerevisiae*, а један од њих је екстрацелуларна вредности рН нижа од 3,5, (Ingledeu, 1999). Током ферментације подлога на бази ретког сока, вредност рН није коригована па се са Сликe 6 може запазити пад рН у току првих 12 h ферментације до вредности од око 4,0, независно од почетног садржаја шећера у хранљивој подлози. У даљем току процеса, вредност рН се није значајно мењала што значи се током укупног трајања ферментације вредност рН задржала у опсегу у којем је могућа ефикасна производња етанола. Према томе, корекција вредности овог параметра није потребна током ферментације подлога на бази ретког сока што поједностављује извођење овог биотехнолошког процеса (Ranković et al., 2009 a).

На основу резултата из оквира овог рада, између екстракционих и ретких сокова из три домаће шећеране није утврђена значајна разлика у погледу укупног садржаја растворених соли. У хранљивим подлогама на бази ретког сока са почетном концентрацијом шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v, садржај TDS-а износи 1,32 2,17 и 2,26 g/l, респективно. Значајније смањење садржаја TDS-а је запажено у току првих 12 h ферментације када су ћелије квасца метболички најактивније. У даљем току ферментације, садржај TDS-а се није значајно мењао. Укупна промена садржаја TDS-а у току процеса ферментације подлога на бази ретког сока износи око 0,1-0,4 g/l, приближно исто као током ферментације подлога на бази екстракционог сока. Након истека 48 h процеса, укупан садржај растворених соли у ферментационим течностима са почетном концентрацијом шећера 5, 10 и $\approx 13\%$ m/v износи 1,23, 2,02 и 1,90 g/l, респективно. Ови подаци указују да ретки сок садржи

довољну количину растворених соли за раст биомасе квасца и продукцију етанола, под примењеним експерименталним условима.

Ретки сок се сматра веома погодном сировином за производњу етанола, али је велики недостатак немогућност његовог чувања у дужем временском периоду услед концентрације шећера која је скоро идеална за раст микроорганизама (Hinková and Bubník, 2001). Експериментално је потврђена могућност производње етанола из ретког сока уз припрему која подразумева само корекцију вредности рН и стерилизацију (Ranković et al., 2009 a). Недостатак ретког сока у односу на екстракциони је виша цена добијања, а предност што током ферментације ретког сока настаје мала количина пене па дозирање антипенушавца није потребно што олакшава вођење овог биотехнолошког процеса и смањује потенцијално оптерећење отпадних токова (Ranković et al., 2009 b). Објашњење највероватније лежи у чињеници да се током чишћења екстракционог сока око 90% сапонина уклони тако да њихов садржај у ретком соку износи свега око 0,004 – 0,008 g/100g суве материје (van der Poel et al., 1998).

5.3.3. Испитивање тока ферментације густог сока

На Слици 7 (А-Д) је приказана промена броја ћелија квасца, укупног садржаја шећера, садржаја укупног азота, укупног садржаја растворених соли (TDS), вредности рН и садржаја етанола током ферментације хранљивих подлога на бази густог сока са почетним садржајем шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v, респективно.

Густи сок се добија упаравњем ретког сока при чему се дешавају извесне хемијске промене, које нису значајне у квантитативном смислу па се квоцијенти чистоће ова два међупроизвода технологије прераде шећерне репе врло мало разлику (Шушић и сар., 1994). Резултати анализе ретких и густих сокова из три домаће шећеране су у складу са наведеним литературним подацима (Табеле 13 и 14).

Резултати приказани на Слици 7, указују на изражен пораст биомасе производног микроорганизама до 12 h ферментације у свим подлогама. У том тренутку број ћелија квасца у ферментационим течностима на бази густог сока са почетним садржајем шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v износи $1,86 \times 10^8$, $1,83 \times 10^8$, $1,96 \times 10^8$, $2,25 \times 10^8$ и $2,15 \times 10^8$ cfu/ml, респективно. У даљем току процеса, број ћелија квасца се благо повећавао па је по истеку 48 h ферментације износио $1,96 \times 10^8$, $2,16 \times 10^8$, $2,15 \times 10^8$, $2,55 \times 10^8$ и $2,36 \times 10^8$ cfu/ml, у течностима са почетним садржајем шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v, респективно. Битно је уочити да је током укупног трајања процеса највећи број ћелија производног микроорганизама забележен у ферментационој течности са почетним садржајем 20% m/v. Мала зависност броја ћелија квасца од почетног садржаја шећера током ферментације је у складу са резултатима других аутора (Govindaswamy and Vane, 2007).

Будући да су раст ћелија квасца и продукција етанола повезани феномени, на основу резултата пораста биомасе се може очекивати изражено повећање садржаја етанола у току првих 12 h ферментације. Добијени резултати су у складу са очекиваним будући да је садржај етанола у 12 h ферментације износио 2,93, 3,57, 4,75, 3,02 и 2,87% m/v у течностима на бази екстракционог сока са почетним садржајима шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v, респективно (Слика 7). Чињеница да је до 12 h процеса садржај етанола брже растао сразмерно почетном садржају шећера у подлози важи у опсегу 5-15% m/v. У ферментационим течностима са почетним садржајем шећера 20 и 25% m/v, продукција етанола у првих 12 h процеса је спорија што указује на инхибиторно дејство високих концентрацијама супстрата. У даљем току ферментације течности са почетном концентрацијом шећера 5% m/v, садржај етанола је стагнирао што је последица исцрпљења супстрата. Садржај етанола је до 24 h ферментације порастао на вредност 5,64 и 8,67% m/v, док је у даљем току забележен благи пораст садржаја овог производа метаболизма квасца до вредности 6,37 и 9,32% m/v на крају ферментације течности са почетним садржајем шећера 10 и 15% m/v, респективно.

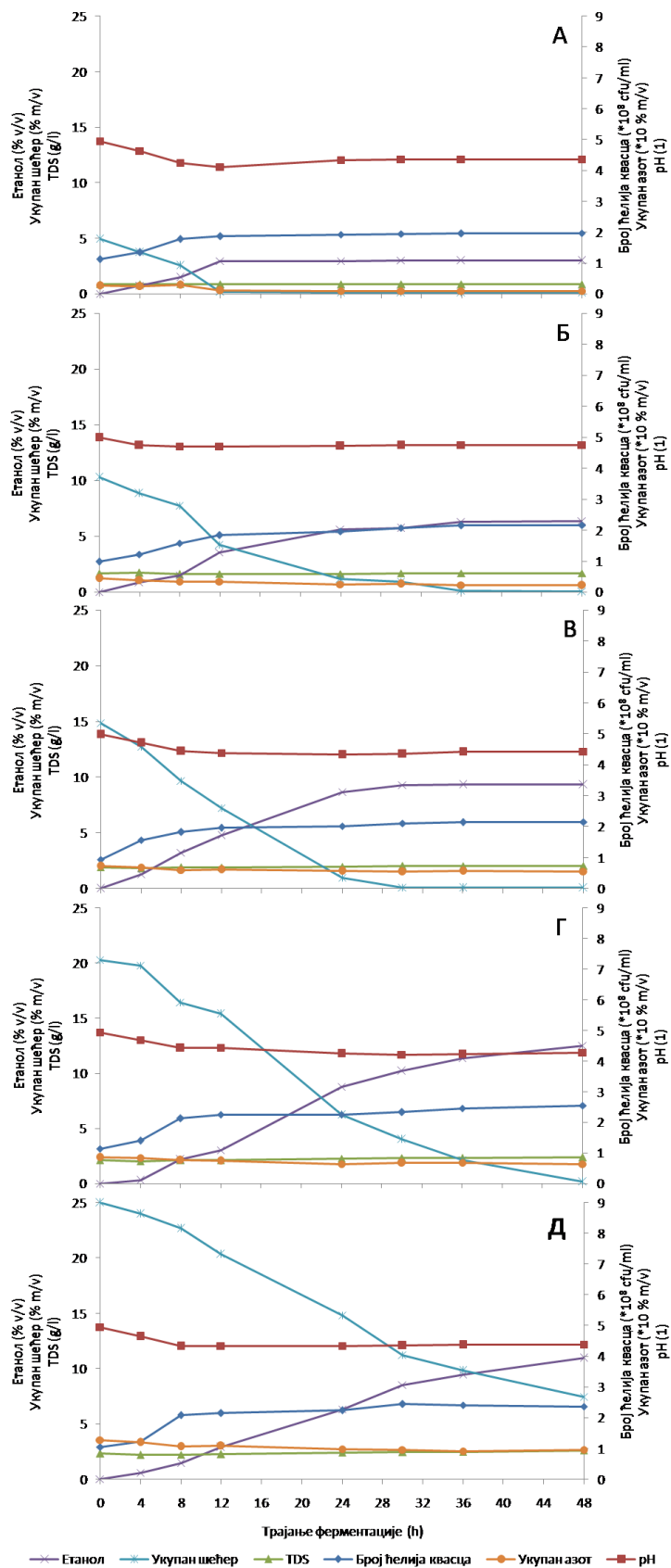
Приказани резултати указују да је могуће скратити трајање ферментације подлога на бази густог сока са почетним садржајем шећера у опсегу 5-15% m/v без негативног утицаја на принос етанола. У ферментационим течностима са почетним садржајем шећера 20 и 25% m/v, током целокупног трајања процеса је забележен значајан раст садржаја етанола, који по истеку 48 h ферментације износи 12,51 и 10,95% m/v, респективно. Нижи садржај етанола у проферментисаној подлози са почетним садржајем шећера 25% m/v у односу на подлогу са стартних 20% m/v шећера указује на значајно инхибиторно дејство високих концентрација супстрата. Добијени резултати су у складу са резултатима других аутора по којима се високе концентрације супстрата које изазивају инхибицију раста и настанка продуката метаболизма налазе у опсегу 5-25% шећера у зависности од утицаја других фактора (Thatipamala et al., 1992; Ergun and Mutlu, 2000).

Резултати приказани на Слици 7 указују да је укупан садржај шећера у ферментационој течности са почетним садржајем шећера 5% m/v занемарљиво мали већ након 12 h трајања процеса ($\approx 0,2\%$ m/v). Преостали садржај шећера у ферментационим течностима са почетним садржајем 10 и 15% m/v је мањи од 1% m/v након 30 h ферментације. У подлогама са почетним садржајем 20 и 25% m/v, укупан садржај шећера опада током целокупног трајања процеса. У ферментационој течности са почетних 20% m/v шећера по истеку 48 h готово целокупна количина шећера је потрошен па његов садржај износи $\approx 0,1\%$ m/v за разлику од ферментационе течности са почетним садржајем шећера 25% m/v у којој по истеку 48 h заостаје значајна количина неутрошеног шећера од $\approx 7,5\%$ m/v. Количина шећера коју производни микроорганизам не утроши током трајања ферментације, након издвајања етанола дестилацијом, остаје у отпадној цибри и представља губитак са становишта технологије етанола и велико органско оптерећење овог ефлуента које у значајној мери доприноси нарушавању квалитета животне средине у коју се одлаже.

На основу резултата приказаних на Слици 7 може се уочити значајно смањење садржаја укупног азота током првих 12 h ферментације хранљивих подлога на бази густог сока са свим примењеним почетним садржајима шећера, што је последица интензивног умножавања биомасе квасца у том временском интервалу. У даљем току процеса, у ферментационој течности са почетним садржајем шећера 5% m/v, садржај укупног азота је остао непромењен док се у свим примењеним течностима на бази густог сока са већим стартним садржајем шећера смањивао до 24 ферментације и након тог периода незнатно варирао. Асимилација једињења азота може бити потиснута при високом садржају шећера (Laoraiboon et al., 2009). Међутим, наведена појава није уочена током експеримената из оквира овог рада. Укупно смањење садржаја азота у подлогама са почетним садржајем шећера 5, 10, 15 и 20% m/v варира у уском опсегу (0,017-0,023% m/v) док је у подлози са почетним садржајем шећера 25% m/v промена већа и износи 0,032% m/v. У свим подлогама на бази густог сока, по завршетку ферментације је преостала извесна количина неискоришћеног азота.

Динамика промене вредности pH је врло слична током ферментације подлога на бази густог сока са свим примењеним почетним садржајима шећера. Забележен је значајнији пад вредности pH у току првих 12 h ферментације и веома благи пораст овог параметра у даљем току процеса. Током укупног трајања ферментације подлога на бази густог сока, вредност pH налази у опсегу 4,2-5,0 што указује да корекција овог параметра није неопходна будући да квасци могу да ефикасно производе етанол при вредностима pH у опсегу 3,5-6,0 (Roehr, 2001).

У току ферментације подлога на бази густог сока не долази до значајне промене TDS-а. Ова чињеница указује да је укупан садржај растворених соли у подлогама на бази густог сока са почетним садржајем шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v довољан за метаболичку активност квасца током умножавања и продукције етанола.



Слика 7: Ток ферментације хранљивих подлога на бази густог сока са почетним садржајем шећера (А) 5% m/v, (Б) 10% m/v, (В) 15% m/v, (Г) 20% m/v и (Д) 25% m/v

Захваљујући високој концентрацији шећера, густо сок се може складиштити и чувати током дужег временског периода, скоро као и меласа. Са друге стране, добијање густог сока је веома компликовано и скупо, што свакако утиче и на цену етанола произведеног из овог међупроизвода технологије шећера (Kunteová, 1996). Могућност производње етанола ферментацијом хранљиве подлоге на бази густог сока је експериментално потврђена уз припрема која подразумева разблажење, корекцију вредности pH и стерилизацију (Dodić et al., 2009 a; Ranković et al., 2009 b).

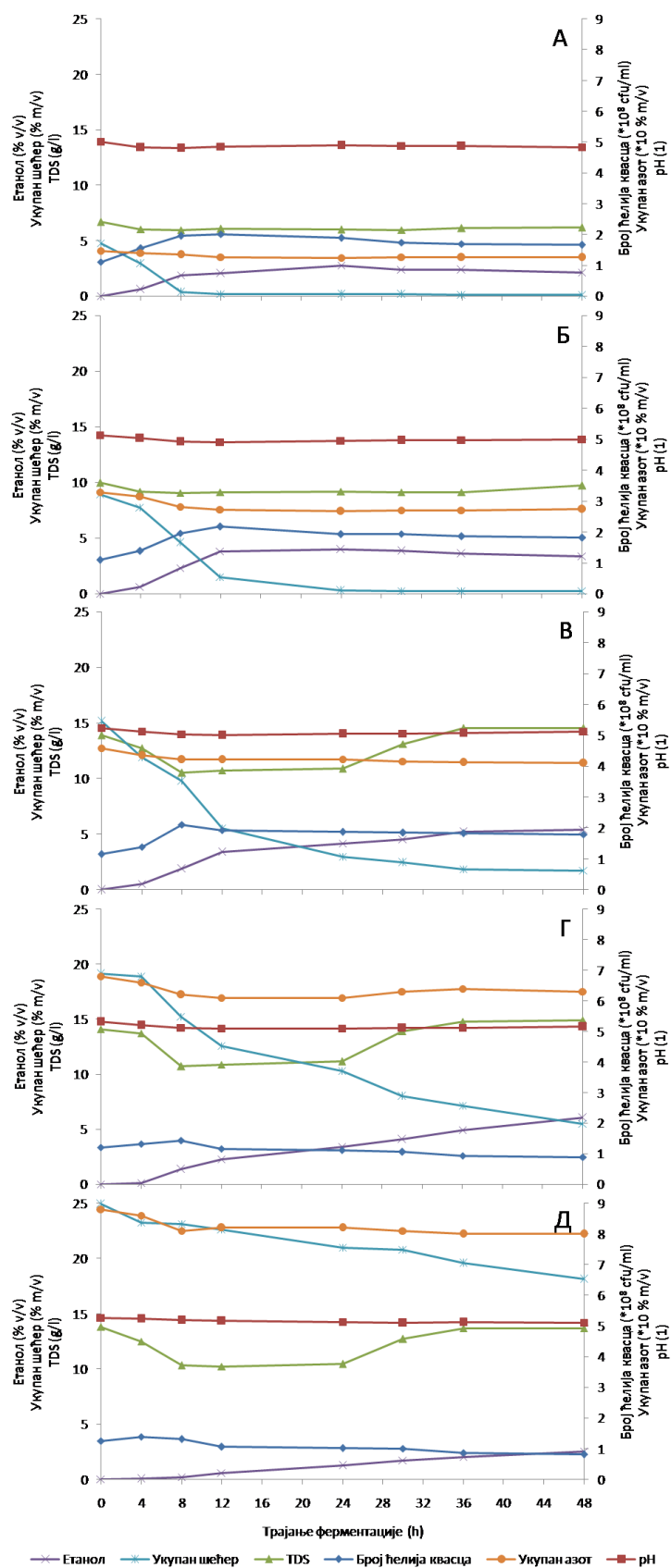
5.3.4. Испитивање тока ферментације меласе

На Слици 8 (А-Д) приказана је промена броја ћелија квасца, укупног садржаја шећера, садржаја укупног азота, укупног садржаја растворених соли (TDS), вредности pH и садржаја етанола током ферментације хранљивих подлога на бази меласе са почетним садржајем шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v, респективно.

У зависности од квалитета шећерне репе и примењене технологије прераде, садржај компонената меласе варира у релативно широком опсегу (Шушић и сар., 1994). На основу резултата приказаних у Табели 15 се може уочити да је меласа из три испитане домаће фабрике шећера уједначеног састава.

На основу резултата приказаних на Слици 8, уочава се изражен пораст биомасе производног микроорганизма до 12 h ферментације подлога на бази меласе са почетним садржајем шећера 5 и 10% m/v до вредности од $2,01 \times 10^8$ и $2,17 \times 10^8$ cfu/ml, респективно. У даљем току процеса, број ћелија квасца у поменутиим ферментационим течностима стагнира. У ферментационим течностима са почетним садржајем шећера 15 и 20% m/v, број ћелија производног микроорганизма се повећао у току првих 8 h ферментације када је износио $2,11 \times 10^8$ и $1,43 \times 10^8$ cfu/ml, респективно, а затим је уследио благи пад садржаја биомасе до истека 48 h процеса. Током ферментације подлоге са почетним садржајем шећера 25% m/v, број ћелија квасца се веома благо повећао у првих 8 h ферментације након чега се количина биомасе смањивала до краја процеса. Очигледно је дејство фактора стреса, који доводи до смањења вијабилности ћелија квасца, израженије у подлогама са већим почетним садржајем шећера. Запажени ефекат није изражен у истој мери приликом испитивања тока ферментације подлога на бази густог сока са истим почетним садржајем шећера што указује да концентрација шећера није једини узрок инхибиције раста производног микроорганизма у подлогама на бази меласе.

На основу резултата приказаних на Слици 8 се уочава пораст садржаја етанола до 12 h ферментације подлога на бази меласе са почетним садржајем шећера 5 и 10% m/v до вредности 2,03 и 3,8% v/v, респективно. У даљем току процеса, садржај етанола у наведеним ферментационим течностима је стагнирао. У ферментационој течности на бази меласе са почетним садржајем шећера 15% m/v, садржај етанола је у 12 h износио 3,37% m/v, а у наставку процеса је забележен лагани пораст садржаја овог примарног производа метаболизма до вредности од 5,4% v/v. Током прва 4 h ферментације подлоге на бази меласе са почетним садржајем шећера 20% m/v, садржај етанола је занемарљиво мали док се од 4 до 48 h процеса запажа постепени пораст садржаја етанола до 6,04% v/v. У подлози са почетним садржајем шећера 25% m/v, значајнији пораст садржаја етанола је забележен тек након 8 h процеса. Међутим, у наведеној ферментационој течности садржај етанола је након 48 h достигао вредност од свега 2,54% v/v (Слика 8). Приказани резултати указују на инхибицију продукције етанола у подлогама са већим почетним садржајем шећера.



Слика 8: Ток ферментације хранљивих подлога на бази меласе са почетним садржајем шећера (А) 5% m/v, (Б) 10% m/v, (В) 15% m/v, (Г) 20% m/v и (Д) 25% m/v

Међутим, када се упореде резултати промене садржаја етанола у подлогама на бази меласе и густог сока са истим почетним садржајем шећера јасно се уочава већа инхибиција продукције етанола у подлогама на бази меласе. Садржај суве материје меласе је већи у односу на садржај суве материје густог сока за око 20% m/m . Међутим, садржај сахарозе је већи у густом соку за 5-10% m/v у односу на меласу (Табеле 14 и 15). Када се ови супстрати разблаже до постизања истог садржаја шећера, тако припремљене хранљиве подлоге се значајно разликују у погледу садржаја суве материје и свих нутријената изузев шећера. Према томе, у подлогама на бази меласе узрок инхибиције раста и продукције етанола је висок осмотски притисак, који је последица високог садржаја шећера и осталих нутријената, а највећи проблем у том смислу представља висок садржај неорганичких соли (Ergun and Mutlu, 2000).

Промена укупног садржаја шећера у подлогама на бази меласе је у складу са динамиком раста производног микроорганизама и продукције етанола (Слика 8). Према томе, из подлоге са почетним садржајем шећера 5% m/v овај нутријент је готово у целости потрошен до 12 h ферментације. У истом периоду се значајно смањило садржај шећера у ферментационој течности са почетним садржајем 10% m/v , а преосталих 1,5% m/v шећера је производни микроорганизам потрошио до 24 h ферментације. Интензивнија потрошња шећера из ферментационе течности са почетним садржајем 15% m/v је забележена у првих 12 h када укупан садржај шећера износи 5,5%, а у даљем току је потрошња овог нутријента знатно спорија тако да по истеку 48 h процеса неискоришћена количина шећера износи 1,7% m/v . У току ферментације подлоге на бази меласе са почетним садржајем шећера 20% m/v забележена је постепена потрошња шећера до краја процеса када заостала количина овог нутријента износи 5,5% m/v . Количина биомасе и етанола, која је настала током процеса ферментације подлоге на бази меласе са почетним садржајем шећера 25% m/v , указује на минималну метаболичку активност квасца па је неискоришћена количина шећера од 18,1% m/v очекиван резултат.

Меласа може да садржи и преко 2% азота, али само око 0,4-0,6% ћелије квасца могу да искористе (Шушић и сар., 1994). Садржај укупног азота у меласи је више од 10 пута већи у односу на садржај овог нутријента у међупроизводима технологије прераде шећерне репе (Табеле 12, 13, 14 и 15). У складу са тим, подлоге на бази меласе имају значајно већи садржај укупног азота у односу на подлоге са истим почетним садржајем шећера, које су припремљене разблаживањем екстракционог, ретког или густог сока. У периоду од 8-12 h ферментације је уочен пораст биомасе у свим подлогама на бази меласе па је смањење садржај укупног азота у том периоду очекивано услед његове инкорпорације у структурна и функционална азотна једињења ћелије. Укупно смањење садржаја азота у подлогама на бази меласе се налази у опсегу 0,021-0,080% m/v . Количина укупног азота која је остала неискоришћена по завршетку процеса износи 0,126, 0,273, 0,410, 0,630, 0,800% m/v у ферментационим течностима на бази меласе са почетним садржајем шећера 5, 10, 15, 20 и 25% m/v , респективно.

Максимална промена вредности рН током ферментације подлога на бази меласе износи 0,2 и значајно је мања у односу на промену истог параметра током ферментације подлога на бази екстракционог, ретког и густог сока. Поред мање изражене метаболичке активности ћелија квасца услед инхибиције осмотског шока, објашњење за мању промену вредности рН је и значајно већи пуферски капацитет ферментационих течности на бази меласе. У меласи и њеним растворима су присутне соли, које се састоје од катјона јаких база (K^+ и Na^+) и анјона слабих органских киселина (млечне, сирћетне, глутарне и др.). Тиме се објашњава постојање пуферних смеша, које имају способност да се одупру промени рН при промени садржаја минералних материја или база у растворима. Поред тога пуферском капацитету меласе доприноси и садржај аминокиселина и протеина. Моћ пуферовања зависи од састава нешећера и њихове количине у меласи, углавном од односа соли калијума, натријума, калцијума и магнезијума, а такође и од количине аминокиселина. Уколико је нижи квоцијент чисте меласе, утолико је већи садржај супстанци које имају способност пуферовања (Шушић и сар., 1994).

Укупан садржај растворених соли у подлогама на бази меласе је значајно већи у односу на садржај у подлогама на бази међупроизвода технологије прераде шећерне репе.

Меласа садржи велики број микроелементата који имају велики значај када се меласа користи у ферментативној индустрији. Микроелементи су неопходни за синтезу и правилно функционисање бројних ензимских система микроорганизама. Поједини микроорганизми немају способност да синтетишу одређене органске супстанце сложеног састава које улазе у састав њихове биомасе или продуката њиховог метаболизма. Међу те супстанце се убрајају витамини и други фактори раста. Квасац *Saccaromyces cerevisiae* није ауксотрофан односно не може да се размножава уколико нису присутни одређени витамини. Значај витамина за раст, размножавање и активност микроорганизама проистиче из чињенице да разни витамини и њихови деривати, нарочито витамини из групе В, улазе у састав многих коензима и простетских група. Садржај витамина у меласи је мали, али довољан, изузев садржаја биотина и то са становишта производње биомасе квасца *Saccaromyces cerevisiae* (Шушић и сар., 1994).

Поступак припреме меласе за ферментацију квасцем *Saccaromyces cerevisiae* обухвата њено разблажење, корекцију вредности рН и стерилизацију. С обзиром да високе концентрације супстрата инхибирају раст квасца и формирање производа метаболизма циљ разблажења меласе је свођење концентрације супстрата на оптималну.

5.4. Оптимизација ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе

На добијање етанола ферментацијом, као и на сваки биотехнолошки процес, утиче велики број фактора. Обично је веома тешко утврдити који од њих имају највећи утицај па је стога пре оптимизације биотехнолошког процеса неопходно испитати његов ток. На основу приказаних резултата испитивања тока ферментације подлога на бази међу- и нуспроизвода технологије прераде шећерне репе, утврђено је да након 48 h ферментације подлога, које су припремљене разблаживањем екстракционог, ретког и густог сока као и меласе до различитог почетног садржаја шећера, заостаје извесна количина неискоришћеног азота као и растворених соли. Може се закључити да сви примењени супстрати садрже довољну количину азота и растворених соли за метаболичку активност квасца као производног микроорганизма током алкохолне ферментације хранљивих подлога добијених разблаживањем примењених супстрата. Према томе, садржај азота и укупан садржај растворених соли не представљају лимитирајуће факторе при примењеним експерименталним условима и неће бити укључени у даље моделовање. Такође је утврђено да вредност рН током укупног трајања ферментације свих примењених хранљивих подлога остаје у опсегу 3,5-6,0 у којем квасци могу ефикасно да производе етанол (Roehr, 2001). Стога ни овај параметар неће бити обухваћен моделовањем применом методе одзивне површине функције.

Као одзиви који ће бити обухваћени даљим моделовањем, дефинисани су број ћелија квасца, укупан садржај шећера и садржај етанола са циљем да добијени модели допринесу бољем разумевању утицаја различитих почетних садржаја шећера и трајања ферментације, као и међусобних интеракција ових варијабли на ток ферментације хранљивих подлога на бази међу- и нуспроизвода технологије прераде шећерне репе.

Крајњи циљ примене методе одзивне површине функције је оптимизација посматраног процеса. За оптимизацију процеса са два или више одзива могуће је применити више оптимизационих поступака, али је једна од најчешће примењиваних метода управо метода жељене (тражене) функције (Јокић, 2010; Khayet i sar., 2008). Применом ове методе решавају се нелинеарни проблеми са ограничењима, која се односе на одабрани опсег експерименталних променљивих. Проблем овог типа може се решити применом модификованог *Harrington*-овог приступа жељене функције у комбинацији са полиномским зависностима посматраних одзива (Derringer, 1994).

Поступак се састоји од низа корака:

- извођење експеримената и фитовање мерених величина применом методе одзивне површине функције (RSM),
- дефинисање жељених функција за сваки од одзива и
- оптимизација укупне жељене функције у односу на параметре експеримента (Jokić, 2010).

5.4.1. Оптимизација ферментације екстракционог сока

За опис одзивних функција броја ћелија квасца (cfu/ml), садржаја етанола (% v/v) и укупног садржаја шећера (% m/v), испитиван је утицај следећих фактора у наведеним опсезима:

X₁: почетни садржај шећера (5-13% m/v) и

X₂: трајање ферментације (0-48 h).

Испитивани опсег почетног садржаја шећера у подлогама на бази екстракционог сока је дефинисан у складу са максималним садржајем шећера, који је последица технолошког поступка добијања овог међупроизвода прераде шећерне репе у домаћим шећеранама. Резултати фитовања одабраних одзива полиномом другог реда су приказани у Табелама 17 и 18.

Табела 17: Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за ток ферментације екстракционог сока

Ефекти	број ћелија квасца (cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
<i>Одсечак</i>			
b_0	0,401762	-0,5999	2,028833
<i>Линеарни</i>			
b_1	0,224124	0,136763	0,448611
b_2	0,036306	0,191683	-0,30299
<i>Квадратни</i>			
b_{11}	-0,01297	-0,00553	0,027817
b_{22}	-0,0007	-0,00442	0,007078
<i>Интеракције</i>			
b_{12}	0,001616	0,01416	-0,02304

У Табели 18 су приказани резултати анализе варијансе моделованих одзива за ток ферментације екстракционог сока. Релативно високе вредности коефицијената детерминације (R^2) указују на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда. Модели полинома другог реда свих посматраних одзива су значајни при нивоу значајности 95% што потврђују F-вредности од 27,4868, 58,4302 и 48,3773 за број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера, респективно. Графици, који приказују поређење експериментално добијених вредности и вредности предвиђених моделом, су приказани у Прилогу 2.

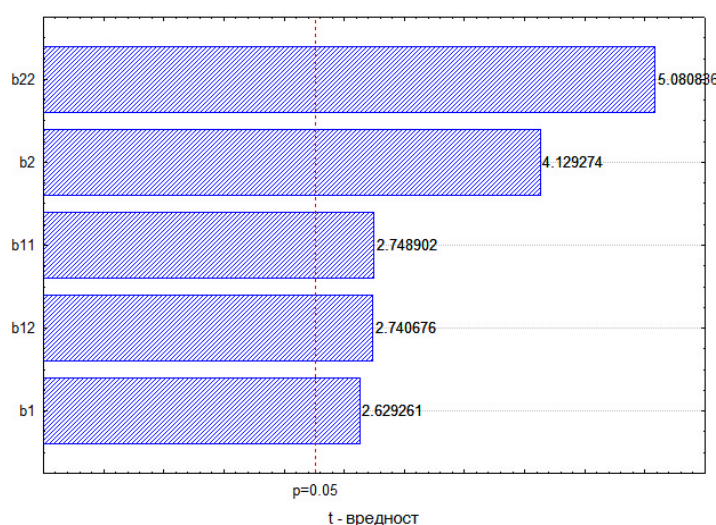
Табела 28: Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за ток ферментације екстракционог сока

Одзив	Порекло								
	Резидуал			Модел			F	p-вредност	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
број ћелија квасца	9	0,147125	0,016347	5	2,2466	0,4493	27,4868	<0,0001	0,904
садржај етанола	9	3,199255	0,355473	5	103,8518	20,7704	58,4302	<0,0001	0,954
укупан садржај шећера	9	8,598083	0,955343	5	231,0845	46,2169	48,3773	<0,0001	0,944

DF – степен слободе; SS – сума квадрата; MS – средња вредност квадрата;

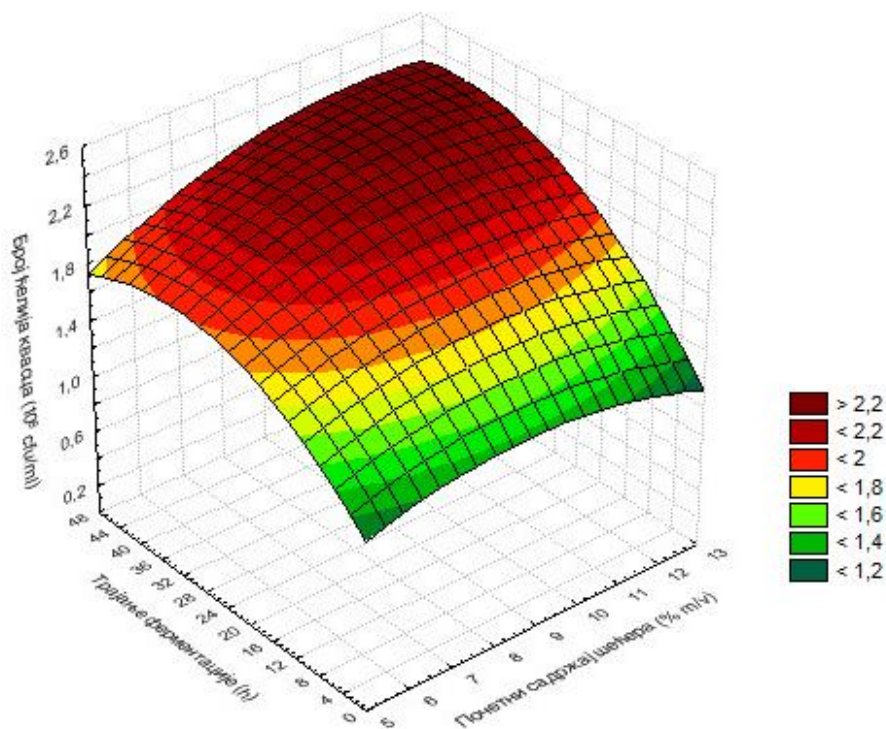
Промена броја ћелија квасца током ферментације фитује се са коефицијентом детерминације од 0,904 што указује да 9,6% варијација није могло бити објашњено моделом. Индивидуални ефекти одабраних фактора и њихових интеракција се могу продискутовати на основу Парето графика приказаног на Слици 9. Ефекти свих параметара, њихових интеракција као и квадратних чланова су стандардизовани, односно подељени са стандардном грешком. Редослед приказа одговара величини њиховог утицаја. Вертикална линија указује на статистичку значајност коефицијената при нивоу значајности од 95%. То значи да је ефекат значајан уколико је *t*-вредност већа од *t*-вредности дефинисане за $p=0,05$ у датом експерименталном плану (Rezzoug and Carpart, 2003).

Посматрајући Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације екстракционог сока (Слика 9) уочава се да су сви ефекти значајни. Највећи ефекат на број ћелија квасца имају квадратни и линеарни члан трајања ферментације. Овакав резултат је у складу са чињеницом да је опсег почетног садржаја шећера у подлогама на бази екстракционог сока релативно мали што је последица максималног садржаја шећера у екстракционим соковима добијеним технолошким поступком који се примењује у домаћим шећеранама. Утицаји квадратног и линеарног члана почетног садржаја шећера као и интеракције овог ефекта са трајањем ферментације су међусобно приближно једнаки.



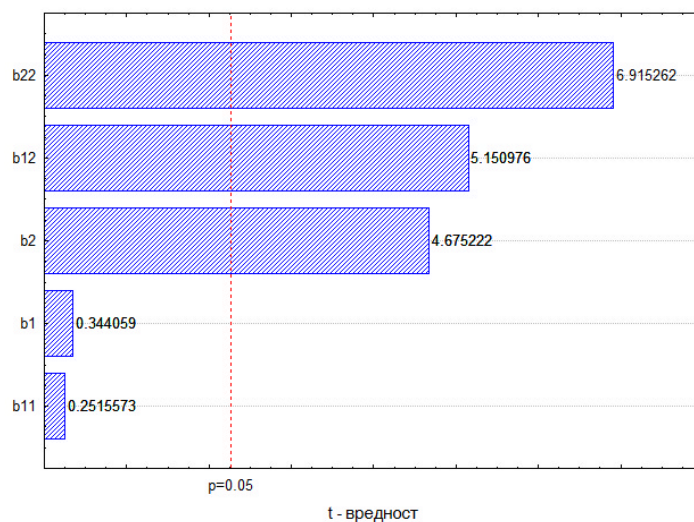
Слика 9: Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације екстракционог сока

На Слици 10 је моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације екстракционог сока. Јасно се уочава готово уједначен пораст броја ћелија квасца у току првих 12 h процеса у испитаном опсегу почетног садржаја шећера. У даљем току ферментације, при малом почетном садржају шећера, број ћелија квасца лагано расте до 24 h након чега следи стагнација вредности овог одзива. Са порастом почетног садржаја шећера, продужава се трајање фазе интензивног раста броја ћелија квасца као и крајња вредност овог одзива. Максималан број ћелија квасца у вредности од преко $2,2 \times 10^8$ cfu/ml предвиђен је моделом у опсегу почетног садржаја шећера 10-13% m/v и трајања ферментације 28-48 h.



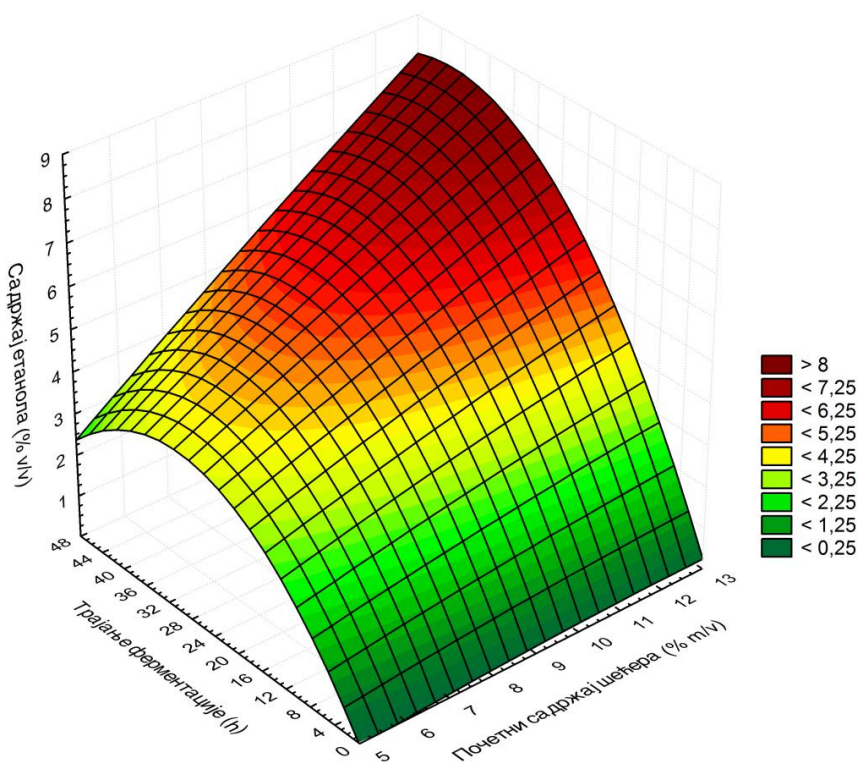
Слика 10: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације екстракционог сока

Најбоље се фитују резултати промене садржаја етанола будући да коефицијент детерминације од 0,954 указује да свега 4,6% варијација није могло бити објашњено моделом. На основу Парето графика стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације екстракционог сока (Слика 11) може се запазити да највећи ефекат на овај одзив има квадратни члан трајања ферментације. Нешто мањи утицај на садржај етанола има линеарни члан трајања ферментације као и интеракција почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Утицаји квадратног и линеарног члана почетног садржаја шећера нису статистички значајни при нивоу значајности од 95%.



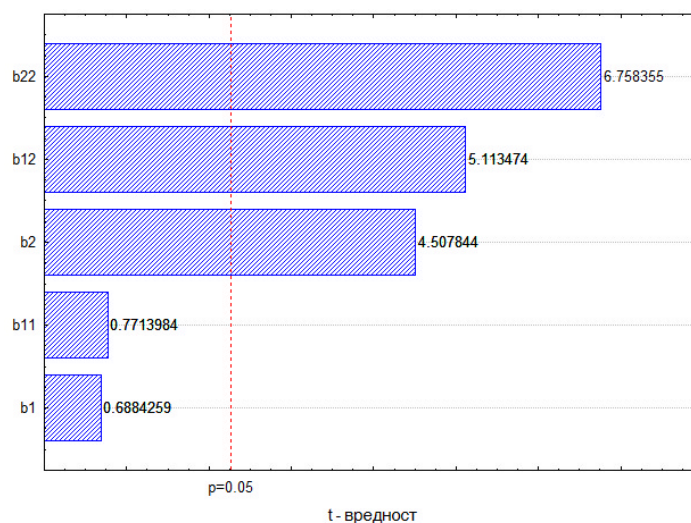
Слика 11: Парето график стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације екстракционог сока

На Слици 12 се види утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације екстракционог сока како га предвиђа модел. Евидентан је пораст садржаја етанола у целокупном примењеном опсегу почетног садржаја шећера. Предвиђени пораст јасно је изражен у току првих 12 h процеса при чему је интензивнији при већим вредностима почетног садржаја шећера. Са даљим продужетком трајања ферментације, при малим вредностима почетног садржаја шећера, долази до благог пораста, а затим и пада садржаја етанола. Насупрот томе, у опсегу почетног садржаја шећера 9-13% не уочава се смањење пад садржаја етанола. Крајња вредност испитаног одзива је прорционална почетном садржају шећера, а максималну вредност садржаја етанола од око 8,0% m/v је модел предвиђа у опсегу почетног садржаја шећера 11-13% m/v и трајању ферментације 24-48 h.



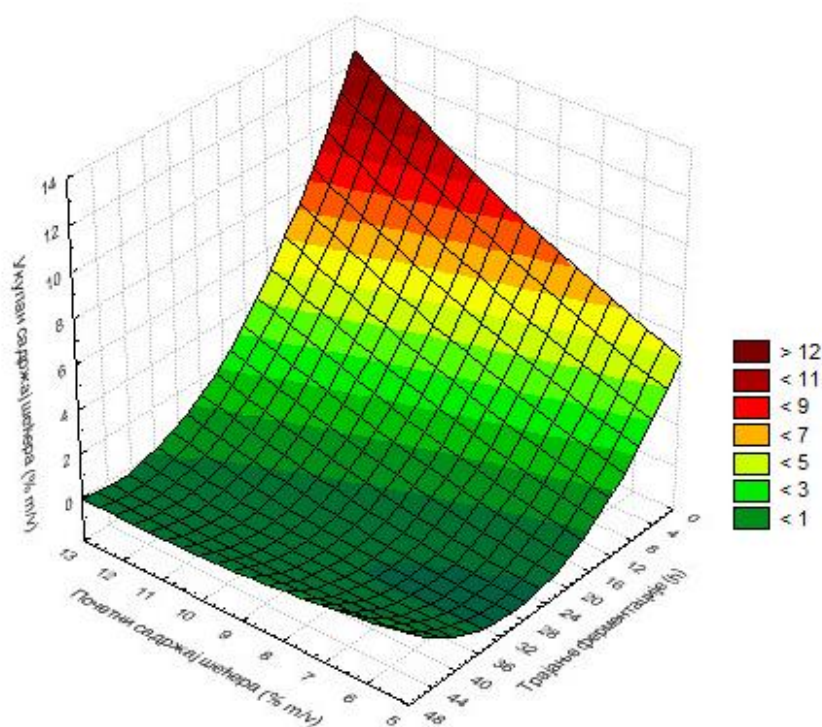
Слика 12: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације екстракционог сока

Фитовање резултата промене укупног садржаја шећера током трајања ферментације екстракционог сока је адекватно будући да коефицијент детерминације износи 0,944 што значи да само 5,6% варијација није објашњено моделом. На Слици 13 је приказан Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације екстракционог сока са којег се може запазити да највећи ефекат на укупан садржај шећера током ферментације екстракционог сока има квадратни члан трајања ферментације. Нешто мањи утицај на овај одзив има линеарни члан трајања ферментације као и интеракција почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Утицаји квадратног и линеарног члана почетног садржаја шећера немају статистички значајан утицај на укупну промену садржаја шећера при нивоу значајности од 95%.



Слика 13: Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације екстракционог сока

На Слици 14 је приказан моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на укупан садржај шећера током ферментације екстракционог сока. Може се запазити да се вредност одзива брже смањује у току првих 12 h процеса при чему је уочено смањење израженије при већим вредностима почетног садржаја шећера. Укупан садржај шећера се на основу превиђања модела смањује на вредност нижу од 1% m/v у опсегу трајања ферментације 8-24 h, у зависности од почетног садржаја шећера. Ови резултати указују да дуже трајање ферментације није оправдано уколико се примењује шаржни поступак.



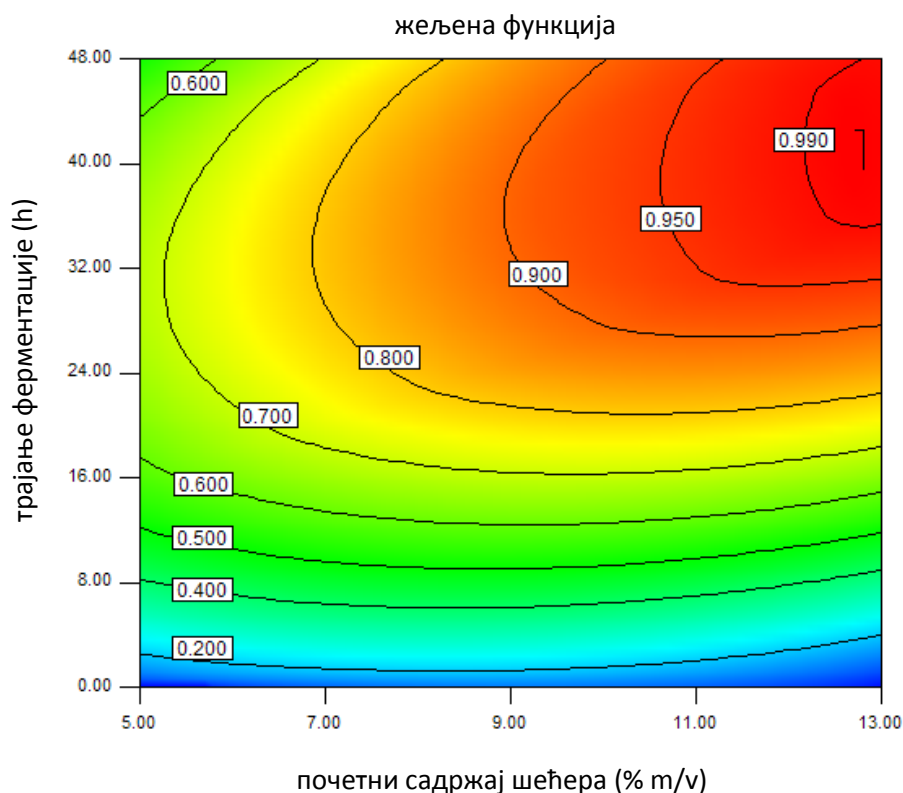
Слика 14: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на укупан садржај шећера током ферментације екстракционог сока

За дефинисање оптималног почетног садржаја шећера и трајања ферментације хранљиве подлоге на бази екстракционог сока примењена је методе жељене функције. Ова метода је једна од најшире примењиваних метода у науци и инжењерству за оптимизацију процеса са више одзива (Khayet et al., 2008).

У овом раду за оптимизацију ферментације екстракционог сока, одабрани одзиви су број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера. У хранљивим подлогама на бази екстракционог сока, као и других међупроизвода прераде шећерне репе, најзаступљенији извор угљеника је сахароза, дисахарид чије усвајање од стране квасца започиње екстерном ензимском хидролизом β -фруктофуранозидне везе молекула помоћу ензима инвертазе. Под анаеробним условима квасци метаболишу D-глукозу и D-фруктозу стварајући етанол и угљендиоксид уз ослобађање одређене количине енергије (Madigan, 2000). Два молекула АТФ-а настала током гликолизе утроше се за биосинтезу ћелија квасца, која обухвата различите енергетски захтевне биореакције. Стога је продукција етанола чврсто повезана са растом ћелија квасца, односно биомаса се мора производити као копроизвод. Без континуалне потрошње АТФ-а услед раста ћелија квасца, гликолиза као метаболички пут глукозе би била одмах обустављена због интрацелуларне акумулације АТФ-а, који инхибира фосфофруктокиназу, један од најважнијих ензима за регулацију гликолизе (Bai et al., 2008). Биотехнолошки процеси се често оптимизују тако што се максимизује број ћелија производног микроорганизама (Liberge i sar., 1994). У складу са литературним подацима, а у циљу постизања максималног приноса етанола, одабрани одзиви број ћелија квасца и садржај етанола траба да буду максимални, односно њихове индивидуалне жељене функције треба да имају што већу вредност, идеално 1.

Један од критеријума економичности процеса ферментације је количина неискоришћеног шећера, која не би смела да износи више од 0,5% m/v (Bai et al., 2008). Будући да количина шећера коју производни микроорганизам не утроши током трајања ферментације, након издвајања етанола дестилацијом, остаје у отпадној цибри и представља губитак са становишта технологије етанола, одзив укупног садржаја шећера треба да буде минималан.

Према наведеном, циљ оптимизације је одабир почетног садржаја шећера и трајања ферментације за које ће одабрани одзив броја ћелија квасца и садржаја етанола бити максималан, а укупног садржаја шећера минималан. На Слици 15 су приказани резултати оптимизације експерименталних вредности почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Највише вредности укупне жељене функције добијене су при високим вредностима почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Трајање ферментације, при којем жељена функција износи преко 0,900 се налази у опсегу 26-48 h док почетни садржај шећера варира у опсегу 9-13% m/v.



Слика 15: Зависност вредности укупне жељене функције од почетног садржаја шећера и трајања ферментације подлога на бази екстракционог сока

При максималној вредности укупне жељене функције, која износи 1, индивидуалне жељене функције представљају најбоље вредности сва три одабрана одзива, односно њихове вредности такође износе 1. Оптималне вредности варираних параметара, при којим жељена функција има највећу вредност су почетни садржај шећера 12,71% m/v и трајање ферментације 38 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $2,31 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 7,99% v/v и укупан садржај шећера приближно једнак нули.

5.4.3. Оптимизација ферментације ретког сока

За опис одзивних функција броја ћелија квасца (cfu/ml), садржаја етанола (% v/v) и укупног садржаја шећера (% m/v), испитиван је утицај следећих фактора у наведеним опсезима:

X_1 : почетни садржај шећера (5-13% m/v) и

X_2 : трајање ферментације (0-48 h).

Испитивани опсег почетног садржаја шећера у подлогама на бази ретког сока, као и код екстракционог сока, је дефинисан у складу са максималним садржајем шећера, који је последица технолошког поступка добијања овог међупроизвода прераде шећерне репе у домаћим шећеранама. Резултати фитовања одабраних одзива полиномом другог реда су приказани у Табелама 19 и 20.

Табела 19: Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за ток ферментације ретког сока

Ефекти	број ћелија квасца (cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
<i>Одсечак</i>			
b_0	1,119831	-0,70823	1,220978
<i>Линеарни</i>			
b_1	-0,02021	0,189507	0,708486
b_2	0,058143	0,186095	-0,2957
<i>Квадратни</i>			
b_{11}	0,001462	-0,00872	0,012848
b_{22}	-0,00087	-0,00413	0,006604
<i>Интеракције</i>			
b_{12}	0,000487	0,013423	-0,02155

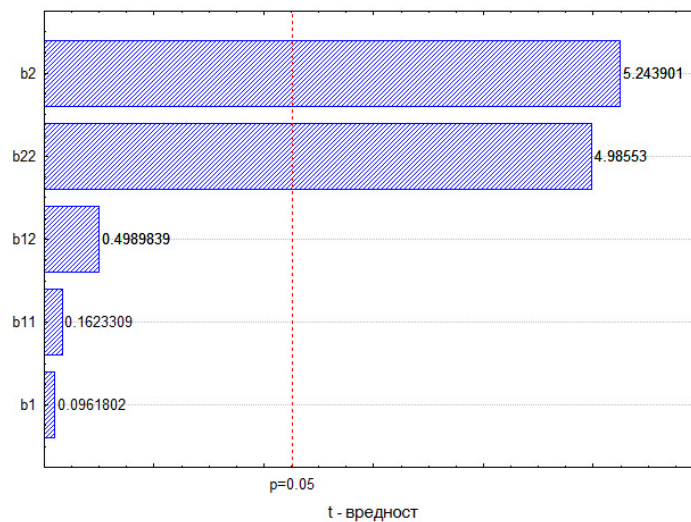
У Табели 20 су приказани резултати анализе варијансе моделованих одзива за ток ферментације ретког сока. Релативно високе вредности коефицијената детерминације (R^2) указују на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда. Модели полинома другог реда свих посматраних одзива су значајни при нивоу значајности 95% што потврђују F-вредности од 22,0138, 119,4299 и 90,25246 за број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера, респективно. Графици, који приказују поређење експериментално добијених вредности и вредности предвиђених моделом, су приказани у Прилогу 2.

Табела 22: Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за ток ферментације ретког сока

Одзив	Порекло								
	Резидуал			Модел			F	p-вредност	R^2
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
број ћелија квасца	9	0,251835	0,027982	5	2,7720	0,55438	22,0138	<0,0001	0,875
садржај етанола	9	1,917437	0,213049	5	114,4997	22,89993	119,4299	<0,0001	0,975
укупан садржај шећера	9	5,209552	0,578839	5	235,0874	47,01748	90,25246	<0,0001	0,967

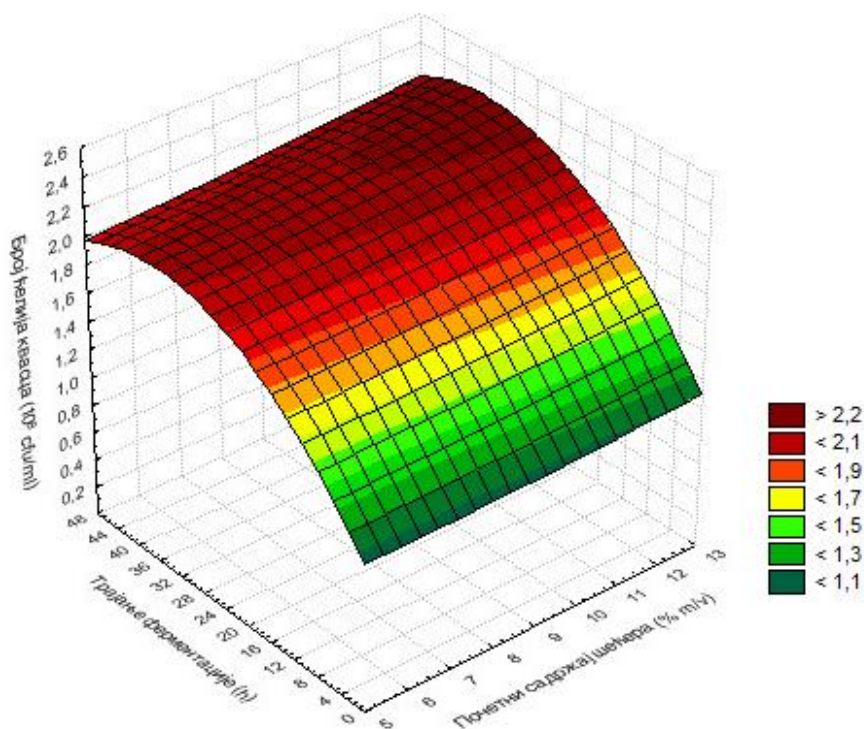
DF – степен слободе; SS – сума квадрата; MS – средња вредност квадрата;

За фитовање резултата промене броја ћелија квасца током ферментације је добијена вредност коефицијента детерминације, који износи 0,875 и указује да 12,5% варијација није могло бити објашњено моделом. Индивидуални ефекти одабраних фактора и њихових интеракција се могу уочити на основу Парето графика приказаног на Слици 16. Посматрајући Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације ретког сока уочава се да највећи ефекат на посматрани одзив имају линеарни и квадратни члан трајања ферментације. Овај резултат је у складу са резултатом добијеним моделовањем одзива броја ћелија квасца током ферментације екстракционог сока, који има исти опсег почетног садржаја шећера. Утицаји квадратног и линеарног члана почетног садржаја шећера као и интеракције овог ефекта са трајањем ферментације нису значајни при нивоу значајности 95%.



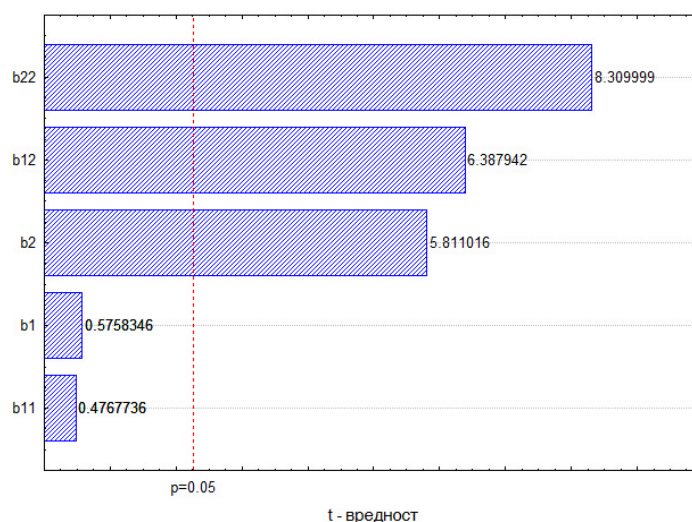
Слика 16: Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације ретког сока

На Слици 17 је моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације ретког сока. Анализом приказане одзивне површине уочава се да је раст броја ћелија квасца током трајања ферментације уједначен у целокупном испитаном опсегу почетног садржаја шећера и више изражен у току првих 12 h процеса. Максималан број ћелија квасца у вредности од преко $2,2 \times 10^8$ cfu/ml моделом предвиђа у опсегу почетног садржаја шећера 10-13% m/v и трајања ферментације 24-48 h.



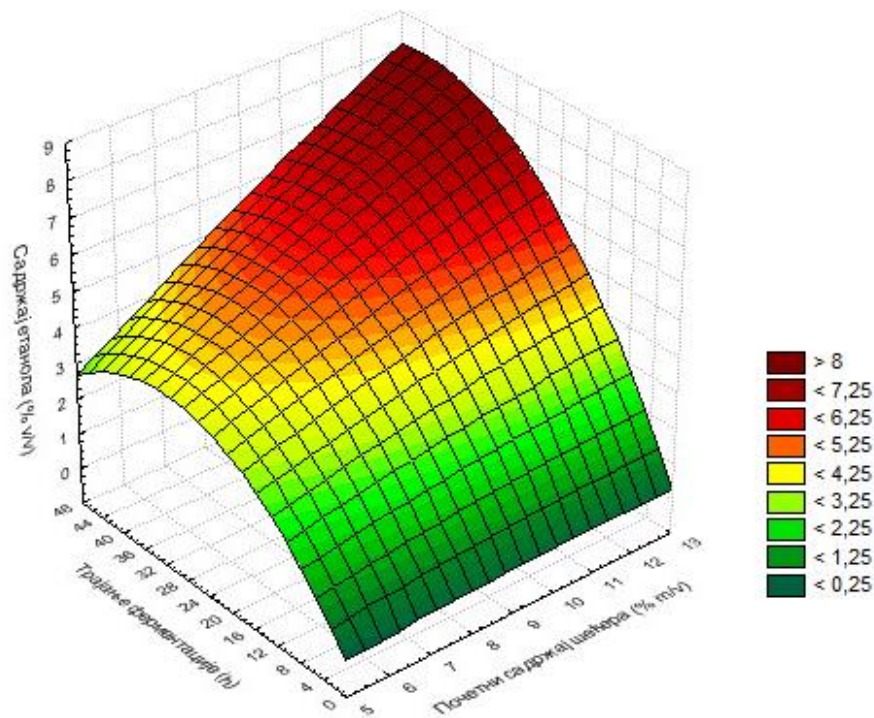
Слика 17: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације ретког сока

Коефицијент детерминације добијени за фитовање резултата промене садржаја етанола износи 0,975 што указује на адекватно фитовање резултата будући да свега 2,5% варијација није могло бити објашњено моделом. На основу Парето графика стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације ретког сока, који је приказан на Слици 18, може се запазити да највећи ефекат на овај одзив има квадратни члан трајања ферментације. Мањи, али такође статистички значајан утицај на садржај етанола има интеракција почетног садржаја шећера и трајања ферментације као и линарни члан трајања ферментације. Утицај линеарног и квадратног члана почетног садржаја шећера нису статистички значајни при нивоу значајности од 95%.



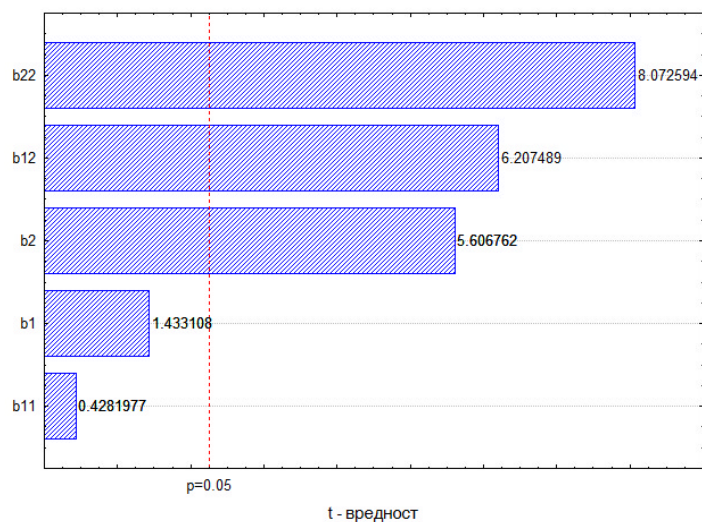
Слика 18: Парето график стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације ретког сока

Са Сликe 19 се може уочити утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације ретког сока како га предвиђа модел. Јасно се види да је пораст садржаја етанола изражен у току првих 12 h трајања ферментације при почетном садржају шећера 5% m/v. Интензиван раст посматраног одзива при већем почетном садржају шећера траје дуже. При максималном примењеном почетном садржају шећера, садржај етанола се повећава током укупног трајања ферментације. Максималан садржај етанола од око 8,0% m/v према предвиђањима модела је постигнут при почетном садржају шећера 12-13% m/v и трајању ферментације 36-48 h.



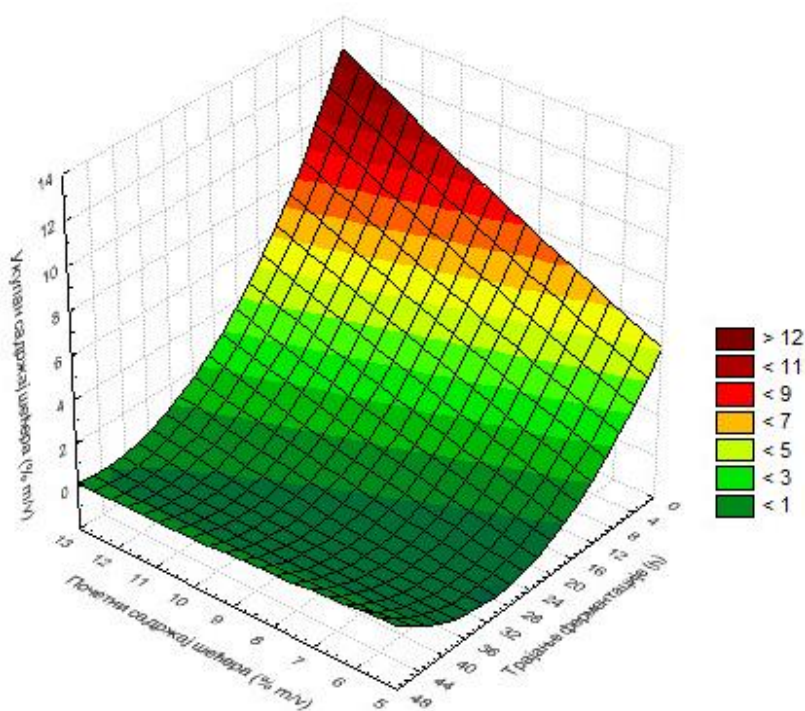
Слика 19: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације ретког сока

Фитовање резултата промене укупног садржаја шећера током трајања ферментације ретког сока је адекватно будући да коефицијент детерминације износи 0,967 што значи да само 3,3% варијација не може бити објашњено моделом. На Слици 20 је приказан Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације ретког сока са којег се може запатити да највећи ефекат на посматрани одзив има квадратни члан трајања ферментације. Нешто је мањи ефекат интеракције почетног садржаја шећера и трајања ферментације, као и линеарног члан трајања ферментације. При нивоу значајности од 95%, линеарни и квадратни члан утицаја почетног садржаја шећера нису статистички значајни.



Слика 20: Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације ретког сока

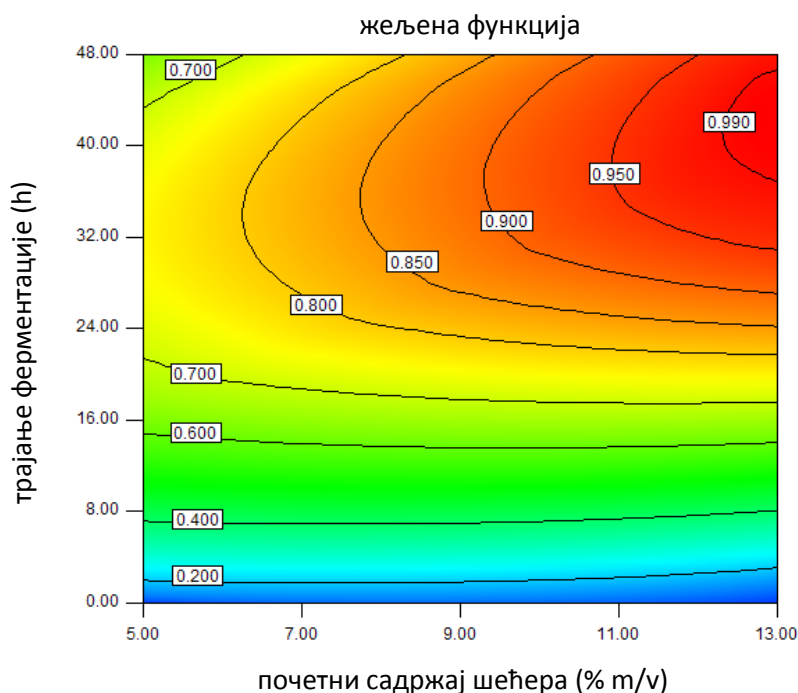
На Слици 21 је приказан моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на укупан садржај шећера током ферментације ретког сока. Укупан садржај шећера се смањило до вредности од око 1% m/v током 12 h трајања ферментације при почетном садржају шећера 5% m/v док је овако ниска вредност посматраног одзива при максималном примењеном почетном садржају шећера забележена тек након 36 h трајања ферментације.



Слика 21: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на укупан садржај шећера током ферментације ретког сока

Метода жељене функције је примењена за оптимизацију почетног садржаја шећера и трајања ферментације хранљиве подлоге на бази ретког сока. Одабрани одзиви броја ћелија квасца и садржаја етанола треба да буду максимални, односно њихове индивидуалне жељене функције треба да имају што већу вредност, идеално 1. Одзив укупног садржаја шећера треба да буде минималан како би се повећало искоришћење супстрата и смањили трошкови производње. Укупна жељена функција једнака је геометријској средини појединачних жељених функција.

На Слици 22 су приказани резултати оптимизације експерименталних вредности почетног садржаја шећера и трајања ферментације ретког сока. Највише вредности укупне жељене функције добијене су при високим вредностима почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Трајање ферментације, при којем жељена функција износи преко 0,900 се налази у опсегу 38-48 h док почетни садржај шећера варира у опсегу 9,5-13% m/v.



Слика 22: Зависност укупне жељене функције од почетног садржаја шећера и трајања ферментације подлога на бази ретког сока

Максимална вредност укупне жељене функције износи 1 што указује да и индивидуалне жељене функције износе 1, односно представљају најбоље вредности сва три одабрана одзива. Оптималне вредности варираних параметара, при којим жељена функција има највећу вредност, односно износи 1, су почетни садржај шећера 12,75% m/v и трајање ферментације 42 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $2,27 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 8,01% v/v и укупан садржај шећера 0,03 % m/v.

5.4.3. Оптимизација ферментације густог сока

За опис одзивних функција броја ћелија квасца (cfu/ml), садржаја етанола (% v/v) и укупног садржаја шећера (% m/v), испитиван је утицај следећих фактора у наведеним опсезима:

X_1 : почетни садржај шећера (5-25% m/v) и

X_2 : трајање ферментације (0-48 h).

Испитивани опсег почетног садржаја шећера у подлогама на бази густог сока је дефинисан у складу са литературним подацима према којим при концентрацијама шећера у опсегу 5-25% долази до значајне инхибиције супстратом док при већим концентрацијама долази до потпуне инхибиције раста (Thatipamala et al., 1992; Ergun and Mutlu, 2000). Поред инхибиције супстратом и осмотски притисак представља фактор стреса за ћелије квасца, а великом осмотском притиску могу да допринесу и други састојци подлоге. Будући да међ- и нуспроизводи технологије имају сложен састав неопходно је извршити оптимизацију на основу експерименталних резултата добијених применом ефлуената карактеристичног састава за процес прераде у домаћим шећеранама. Резултати фитовања одабраних одзива полиномом другог реда су приказани у Табелама 21 и 22.

Табела 21: Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за ток ферментације густог сока

Ефекти	број ћелија квасца (cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
<i>Одсечак</i>			
b_0	1,0232285	-3,14911	4,687514
<i>Линеарни</i>			
b_1	0,008285	0,611497	0,080846
b_2	0,058754	0,196977	-0,31863
<i>Квадратни</i>			
b_{11}	-0,0000405	-0,02219	0,033697
b_{22}	-0,0091	-0,00368	0,005964
<i>Интеракције</i>			
b_{12}	0,00043	0,010482	-0,01676

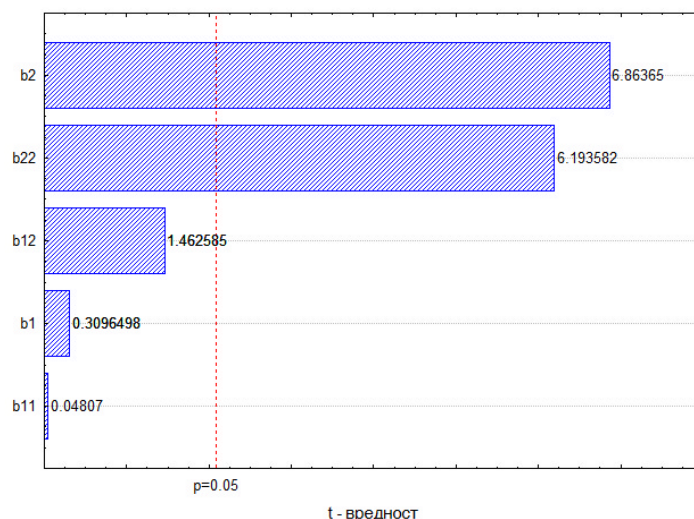
У Табели 22 су приказани резултати анализе варијансе моделованих одзива за ток ферментације густог сока. Релативно високе вредности коефицијента детерминације (R^2) указују на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда. Модели полинома другог реда свих посматраних одзива су значајни при нивоу значајности 95% о чему сведоче F-вредности од 32,1788, 77,5201 и 115,5386 за број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера, респективно. Графици, који приказују поређење експериментално добијених вредности и вредности предвиђених моделом, су приказани у Прилогу 2.

Табела 22: Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за ток ферментације густог сока

Одзив	Порекло								
	Резидуал			Модел			F	p-вредност	R^2
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
број ћелија квасца	19	0,59214	0,031165	5	5,01	1,003	32,1788	<0,0001	0,866
садржај етанола	19	17,47597	0,919788	5	356,51	71,302	77,5201	<0,0001	0,941
укупан садржај шећера	19	45,26379	2,382305	5	1376,24	275,2481	115,5386	<0,0001	0,960

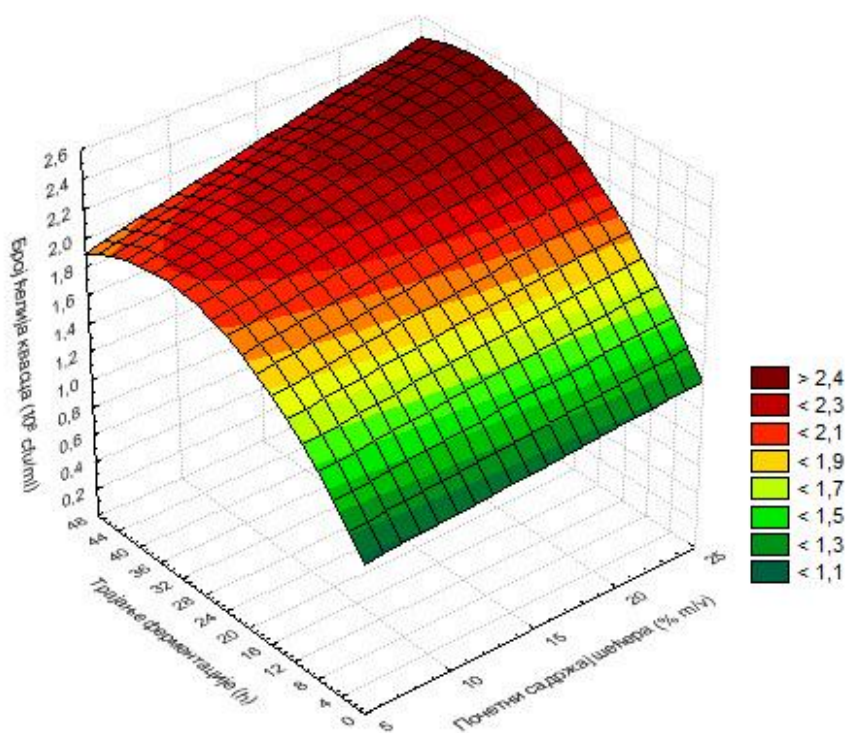
DF – степен слободе; SS – сума квадрата; MS – средња вредност квадрата;

За фитовање резултата промене броја ћелија квасца током ферментације је добијена вредност коефицијента детерминације, који износи 0,866 и указује да 13,4% варијација није објашњено моделом. Индивидуални ефекти одабраних фактора и њихових интеракција су приказани на Парето графику (Слика 23). Посматрајући Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације ретког сока уочава се да статистички значајан ефекат на посматрани одзив имају линеарни и квадратни члан трајања ферментације. Утицај интеракције почетног садржаја шећера и трајања ферментације као и квадратног и линеарног члана почетног садржаја шећера нису значајни при нивоу значајности 95%.



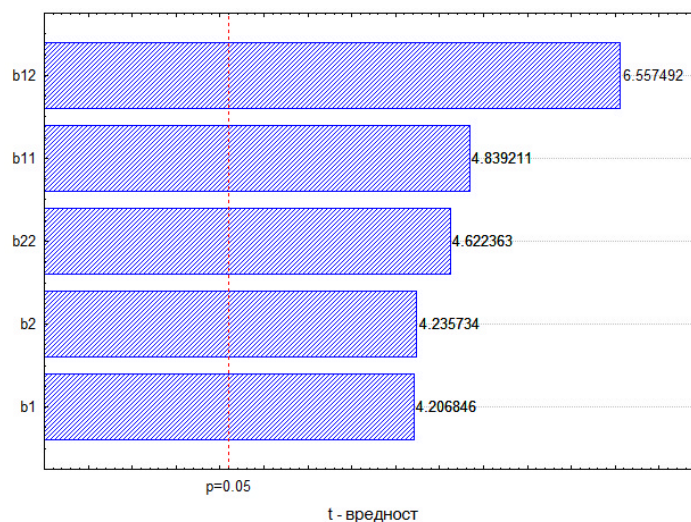
Слика 23: Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације густог сока

На Слици 24 је приказан моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације густог сока. Анализом приказане одзивне површине уочава се да је раст броја ћелија квасца током трајања ферментације интензивнији у току првих 12 h процеса. Са даљим продужетком трајања ферментације модел предвиђа већи пораст броја ћелија квасца при већем почетном садржају шећера. Максималан број ћелија квасца у вредности од око $2,4 \times 10^8$ cfu/ml модел предвиђа у опсегу почетног садржаја шећера 20-25% m/v и трајања ферментације 24-48 h.



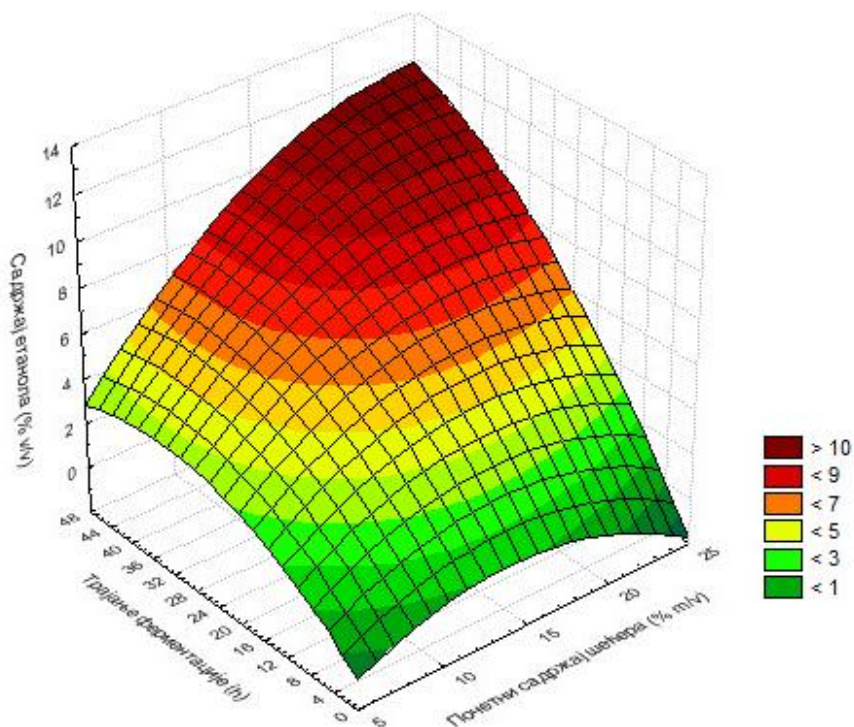
Слика 24: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације густог сока

Коефицијент детерминације фитовања резултата промене садржаја етанола износи 0,941 што указује на адекватно фитовање резултата будући да свега 5,9% варијација није могло бити објашњено моделом. На основу Парето графика стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације густог сока, који је приказан на Слици 25, уочава се да сви чланови полинома другог реда којим су фитовани резултати, имају статистички значајан утицај на посматрани одзив при нивоу значајности од 95%. Највећи утицај на садржај етанола током ферментације густог сока има интеракција почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Нешто мање и приближно једнаке су вредности стандардизованих квадратних ефеката почетног садржаја шећера и трајања ферментације на садржај етанола. Најмањи утицај на посматрани одзив имају линеарни чланови варираних фактора.



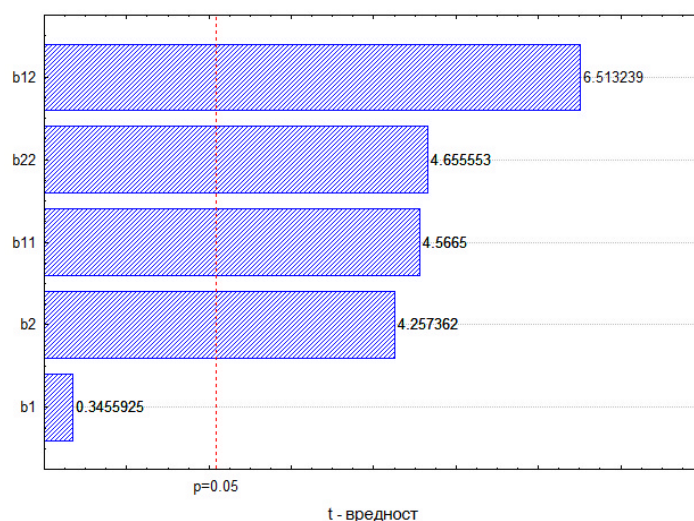
Слика 25: Парето график стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације густог сока

Са Сликe 26 се види моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације густог сока. Предвиђен је више изражен пораст садржаја етанола у току првих 12 h трајања ферментације при минималној вредности почетног садржаја шећера. Интензиван раст посматраног одзива према предвиђањима модела при већем почетном садржају шећера траје дужи, односно при максималној вредности почетног садржаја шећера, садржај етанола се повећава током укупног трајања ферментације. Максималан садржај етанола од близу 12,0% m/v је предвиђен при почетном садржају шећера 20-25% m/v и трајању ферментације 40-48 h.



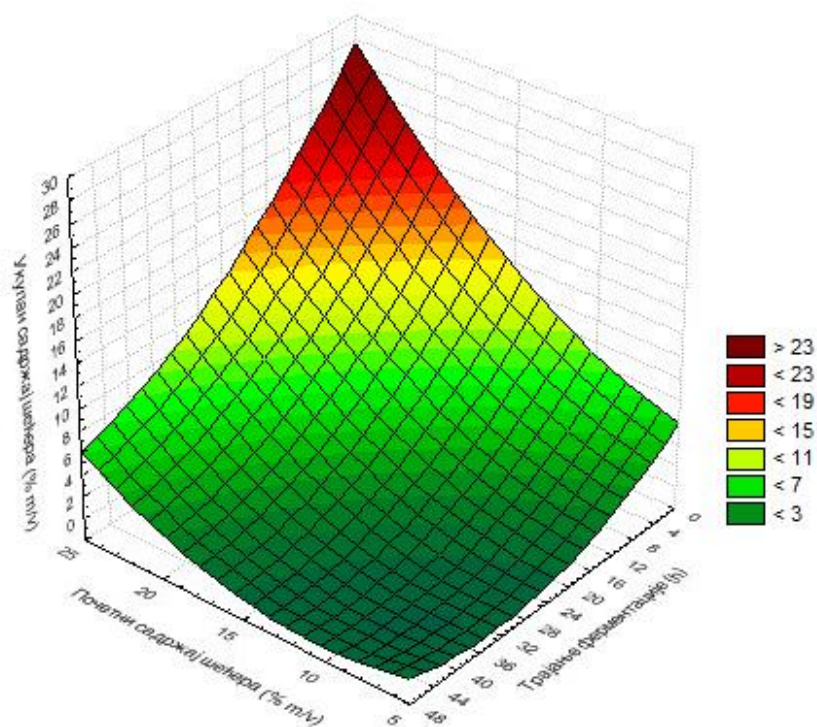
Слика 26: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације густог сока

Фитовање резултата промене укупног садржаја шећера током трајања ферментације густог сока је адекватно будући да коефицијент детерминације износи 0,960 што значи да само 4,0% варијација није објашњено моделом. На Сlici 27 је приказан Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације густог сока са којег се уочава да сви чланови полинома другог реда којим су фитовани резултати, имају статистички значајан утицај на посматрани одзив при нивоу значајности од 95% осим линеарног ефекта почетног садржаја шећера. Највећи утицај на укупан садржај шећера има интеракција почетног садржаја шећера и трајања ферментације. Квадратни чланови трајања ферментације и почетног садржаја шећера, као и линеарни члан трајања ферментације имају приближно једнаке вредности стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације густог сока.



Слика 27: Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације густог сока

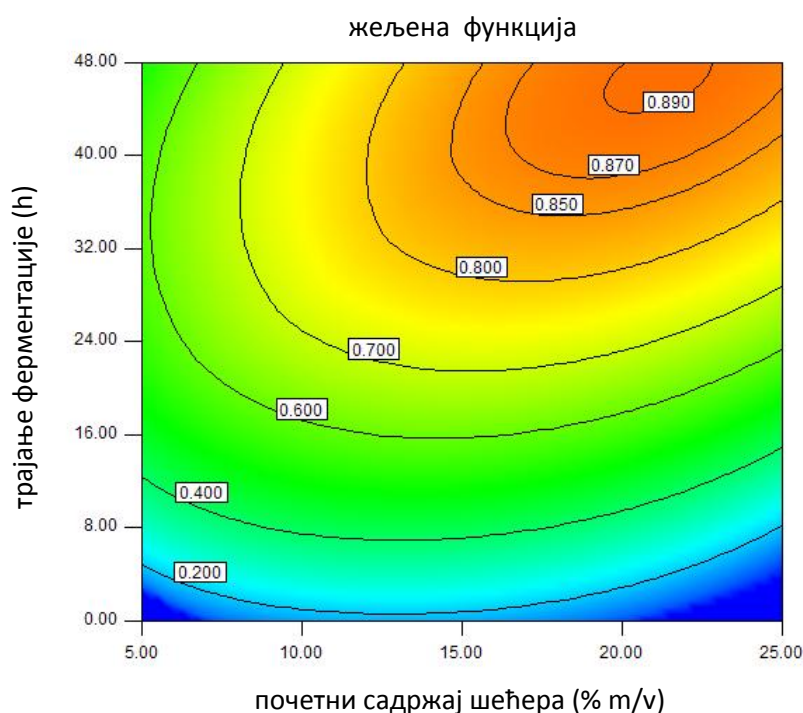
На Слици 28 је приказана моделом предвиђена зависност укупног садржаја шећера у функцији трајања ферментације и почетног садржаја шећера током ферментације густог сока. Може се запазити да се вредност одзива брже смањује у току првих 12 h процеса при чему је пад израженији при већим вредностима почетног садржаја шећера. У опсегу почетног садржаја шећера 5-15% m/v при трајању ферментације преко 24 h укупан садржај шећера је близак нули. При већим вредностима почетног садржаја шећера ни након 48 h трајања ферментације укупан садржај шећера није занемарљиво мали. Са тим у складу, при почетном садржају шећера 25% m/v предвиђен укупан садржај шећера по истеку процеса износи око 7% m/v. Ова количина шећера представља губитак са становишта технологије етанола и представља потврду потребе за оптимизацијом почетног садржаја шећера и трајања ферментације подлога на бази густог сока.



Слика 28: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на укупан садржај шећера током ферментације густог сока

За дефинисање оптималног почетног садржаја шећера и трајања ферментације хранљиве подлоге на бази густог сока примењена је методе жељене функције. На Слици 29 су приказани резултати оптимизације експерименталних вредности. Циљ је био да се утврде вредности почетног садржаја шећера и трајања ферментације при којим се постиже максималан број ћелија и садржај етанола, а минималан укупан садржај шећера, односно при којим индивидуалне жељене функције ових одабраних одзива имају што већу вредност, идеално 1. Оптималне вредности експерименталних параметара одређују се из вредности појединачних жељених функција које оптимизују укупну жељену функцију.

Највиша вредност укупне жељене функције износи 0,892 при чему су вредности појединачних жељених функција следеће: за одзив броја ћелија квасца 0,888, за одзив садржаја етанола 0,910 и за одзив укупног садржаја шећера 0,881. Дефинисане оптималне вредности експерименталних параметара су почетни садржај шећера 21,12% m/v и трајање ферментације 47 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $2,37 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 11,38% v/v и укупан садржај шећера 3,02 % m/v.



Слика 29: Зависност укупне жељене функције од почетног садржаја шећера и трајања ферментације подлога на бази густог сока

5.4.4. Оптимизација ферментације меласе

За опис одзивних функција броја ћелија квасца (cfu/ml), садржаја етанола (% v/v) и укупног садржаја шећера (% m/v), испитиван је утицај следећих фактора у наведеним опсезима:

X_1 : почетни садржај шећера (5-25% m/v) и

X_2 : трајање ферментације (0-48 h).

Испитивани опсег почетног садржаја шећера у подлогама на бази меласе је дефинисан у складу са литературним подацима према којим при концентрацијама шећера у опсегу 5-25% долази до значајне инхибиције супстратом док при већим концентрацијама долази до потпуне инхибиције раста (Thatiramala et al., 1992; Ergun and Mutlu, 2000). Резултати фитовања одабраних одзива полиномом другог реда су приказани у Табелама 23 и 24.

Табела 23: Коефицијенти регресионе једначине моделованих одзива за ток ферментације меласе

Ефекти	број ћелија квасца (cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
<i>Одсечак</i>			
b_0	1,062	-2,50031	7,954286
<i>Линеарни</i>			
b_1	0,058611	0,55796	-0,66734
b_2	0,0429	0,150527	-0,37638
<i>Квадратни</i>			
b_{11}	-0,00257	-0,02072	0,058771
b_{22}	-0,00056	-0,0022	0,005598
<i>Интеракције</i>			
b_{12}	-0,00095	0,002008	-0,0048

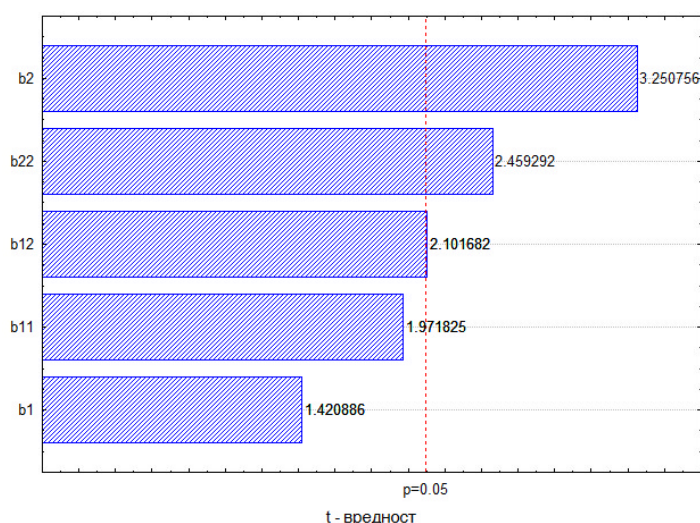
У Табели 24 су приказани резултати анализе варијансе моделованих одзива за ток ферментације подлога на бази меласе. Релативно високе вредности коефицијената детерминације (R^2) указују на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда. Модели полинома другог реда свих посматраних одзива су значајни при нивоу значајности 95% што потврђују F-вредности од 8,6834, 19,8617 и 101,8024 за број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера, респективно. Графици, који приказују поређење експериментално добијених вредности и вредности предвиђених моделом, су приказани у Прилогу 2.

Табела 24: Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива за ток ферментације меласе

Одзив	Порекло								
	Резидуал			Модел					
	DF	SS	MS	DF	SS	MS	F	p-вредност	R^2
број ћелија квасца	19	1,40738	0,074073	5	3,216	0,6432	8,6834	0,0002	0,615
садржај етанола	19	13,02842	0,685706	5	68,096	13,6193	19,8617	<0,0001	0,797
укупан садржај шећера	19	61,19215	3,220639	5	1639,344	327,8687	101,8024	<0,0001	0,954

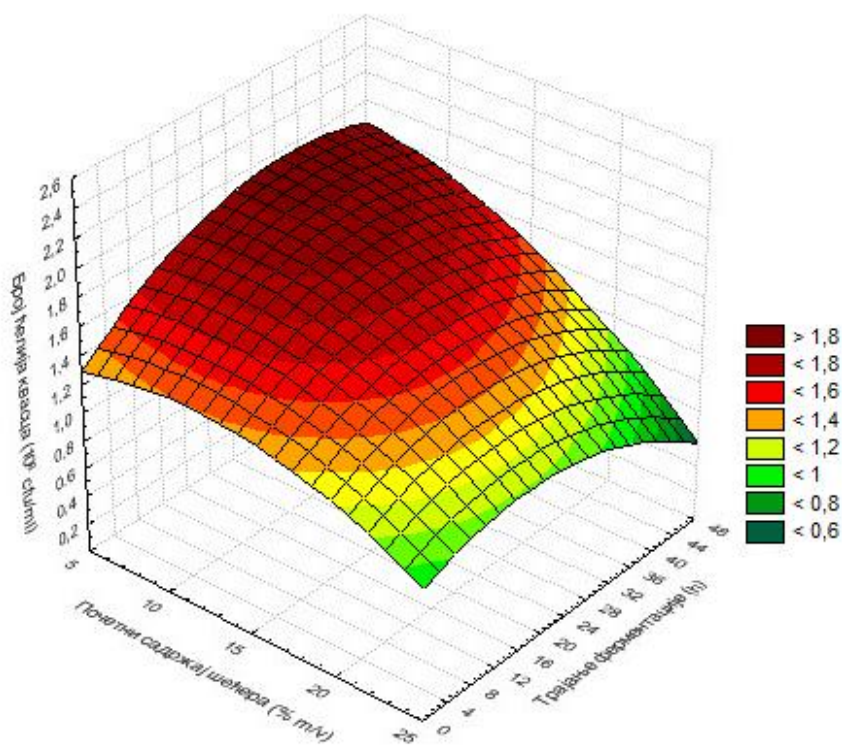
DF – степен слободe; SS – сума квадрата; MS – средња вредност квадрата;

Коефицијент детерминације полинома другог реда за одзив броја ћелија квасца током ферментације меласе износи 0,615 и указује да добијена регресиона једначина није у могућности да објасни 38,5% варијација. Статистичка значајност, p-вредност, добијена за модел указује на значајност модела полинома другог реда при нивоу значајности 95% (p-вредност 0,05; Табела 25) посматраног одзива. Индивидуални ефекти одабраних фактора и њихових интеракција се могу анализирати на основу Парето графика приказаног на Слици 30. На основу приказаних стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације меласе, запажа се да да статистички значајан ефекат на посматрани одзив имају линеарни и квадратни члан трајања ферментације, као и утицај интеракције почетног садржаја шећера и трајања ферментације док квадратни и линеарни члан почетног садржаја шећера нису значајни при нивоу значајности 95%.



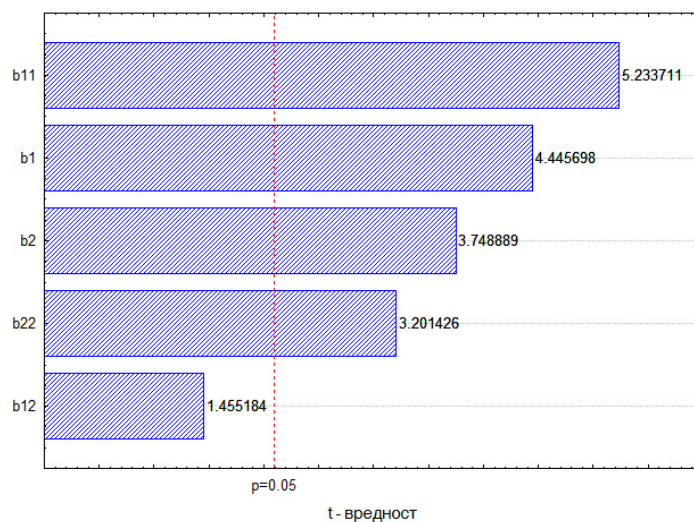
Слика 30: Парето график стандардизованих ефеката на број ћелија квасца током ферментације меласе

Слика 31 илуструје моделом предвиђен утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације меласе. На основу приказане одзивне површине уочава се да је пораст броја ћелија квасца током трајања ферментације значајно израженији у опсегу почетног садржаја шећера 5-15% m/v, очигледно услед инхибиције раста високом концентрацијом супстрата при већим вредностима почетног садржаја шећера. Максималан број ћелија квасца у вредности од преко $1,8 \times 10^8$ cfu/ml је предвиђен у опсегу почетног садржаја шећера 5-10% m/v и трајања ферментације 24-48 h.



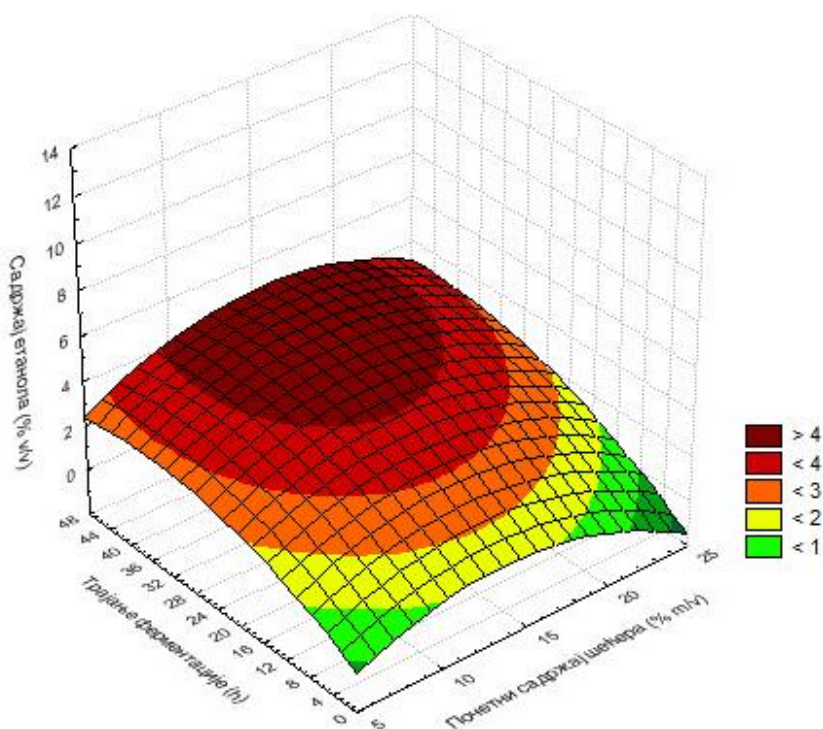
Слика 31: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на број ћелија квасца током ферментације меласе

Вредност коефицијента детерминације 0,797 указује на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда, који не обухвата 20,3% варијација. На Сlici 32 је приказан Парето график стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације меласе. Најзначајнији је квадратни ефекат почетног садржаја шећера. Поред тога, вредности стандардизованих линарних ефеката почетног садржаја шећера и трајања ферментације, као и квадратног ефекта трајања ферментације на посматрани одзив су статистички значајне при нивоу значајности 95%. Током ферментације подлога на бази меласе, под примењеним експерименталним условима, ефекат интеракције почетног садржаја шећера и трајања ферментације није статистички значајан.



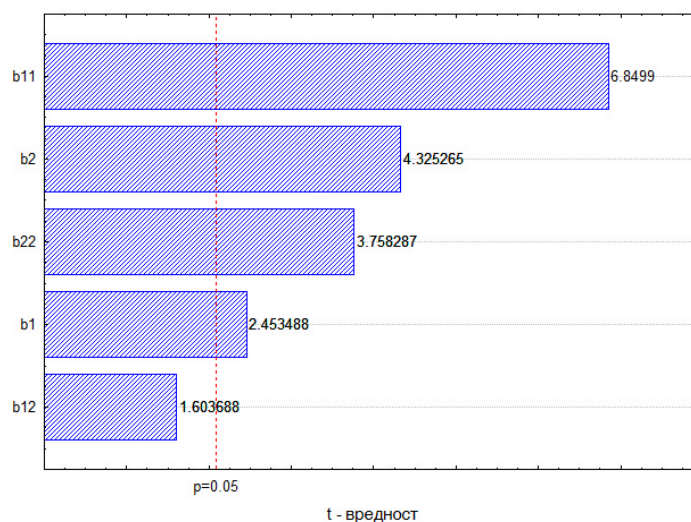
Слика 32: Парето график стандардизованих ефеката на садржај етанола током ферментације меласе

Слика 33 приказује предикцију трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације меласе на основу добијеног модела. На основу приказаних резултата, јасно се запажа да се максималан садржај етанола при почетном садржају шећера од око 15% m/v постиже при трајању ферментације од 24 h. У ширем опсегу вредности почетног садржаја шећера 10-20% m/v, трајање ферментације потребно за постизање садржаја етанола од преко 4% m/v варира у опсегу 24-48 h. Предвиђен максималан садржај етанола при истом опсегу почетног садржаја шећера и трајања ферментације је значајно већи када се као сировина за припрему хранљиве подлоге примени густи сок уместо меласе.



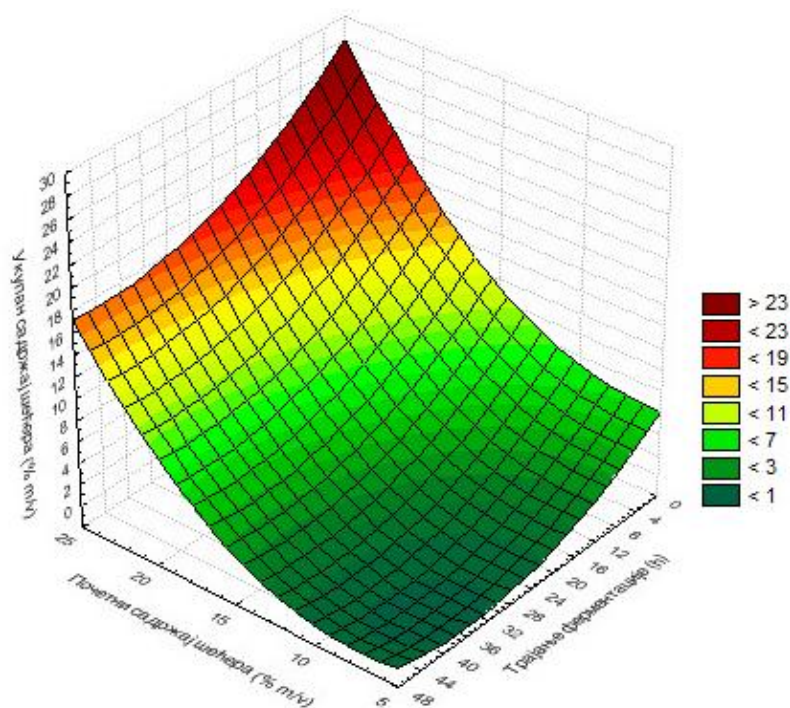
Слика 33: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на садржај етанола током ферментације меласе

Висока вредност коефицијента детерминације од 0,954 указује да полином другог реда добро апроксимира експерименталне резултате за укупан садржај шећера као посматрани одзив будући да свега 4,6% варијација није обухваћено моделом. На Слици 34 је приказан Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације меласе. Са приказаног графика се може запазити да је интеракција почетног садржаја шећера и трајања ферментације једини члан полинома другог реда којим су фитовани резултати, који нема статистички значајан утицај на посматрани одзив при нивоу значајности од 95%. Највећи утицај на укупан садржај шећера током ферментације меласе има квадратни члан почетног садржаја шећера.



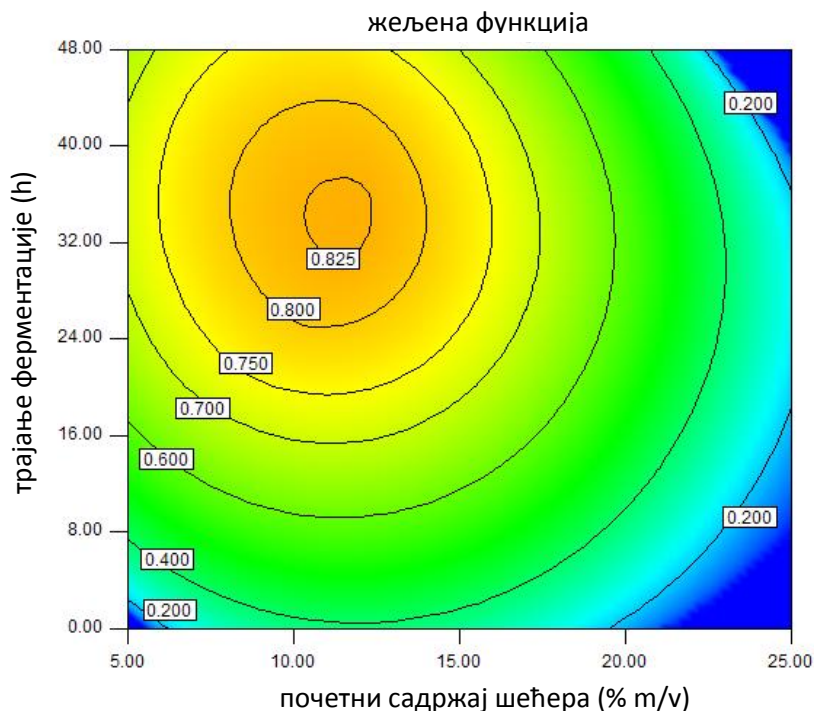
Слика 34: Парето график стандардизованих ефеката на укупан садржај шећера током ферментације меласе

Слика 35 приказује моделом предвиђену зависност укупног садржаја шећера од трајања ферментације и почетног садржаја шећера подлога на бази меласе. Анализом приказаног графика, запажа се да ниске вредности укупног садржаја шећера од око 1% m/v могу бити постигнуте само у опсегу почетног садржаја шећера 5-15% m/v. При већим вредностима почетног садржаја у читавом опсегу трајања ферментације, предвиђене су релативно високе вредности укупног садржаја шећера. Добијени резултати указују да из угла економичности искоришћења сировине није повољно примењивати подлоге на бази меласе са почетним садржајем шећера преко 15% m/v.



Слика 35: Утицај трајања ферментације и почетног садржаја шећера на укупан садржај шећера током ферментације меласе

За оптимизацију ферментације меласе, одабрани одзиви су број ћелија квасца, садржај етанола и укупан садржај шећера. Продукција етанола је чврсто повезана са растом ћелија квасца, односно биомаса се мора производити као копроизвод. У противном, без континуалне потрошње АТФ-а услед раста ћелија квасца, гликолиза као метаболички пут би била одмах обустављена (Vai et al., 2008). Стога, у циљу постизања максималног приноса етанола, одабрани одзиви броја ћелија квасца и садржаја етанола треба да буду максимални. Ради постизања економичне потрошње супстрата, одзив укупног садржаја шећера треба да буде минималан.



Слика 36: Зависност укупне жељене функције од почетног садржаја шећера и трајања ферментације подлога на бази меласе

На Слици 36 приказана је зависност укупне жељене функције од почетног садржаја шећера и трајања ферментације подлога на бази меласе. Вредности појединачне жељене функције за одзив броја ћелија квасца износи 0,757, за одзив садржаја етанола 0,752 и за одзив укупног садржаја шећера 1. У складу са наведеним, највиша вредност укупне жељене функције износи 0,829 и постигнута је при почетном садржају шећера 11,59% m/v и трајању ферментације 34 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $1,84 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 4,54% v/v и укупан садржај шећера је приближно једнак нули.

Резултати добијени применом методе жељене функције су у сагласности са индустријском праксом. У технологији етанола меласа се уобичајено разблажује водом до почетног садржаја шећера 10-18%. При већим концентрацијама, осим инхибиције супстратом, дошло би и до инхибиције етанолом као производом, време ферментације би се продужило, а количина заосталог шећера би била висока. Мале концентрације шећера се не користе из економских разлога (Шушић и сар., 1994).

5.5. Ферментације међупроизвода технологије прераде шећерне репе у увећаним размерама

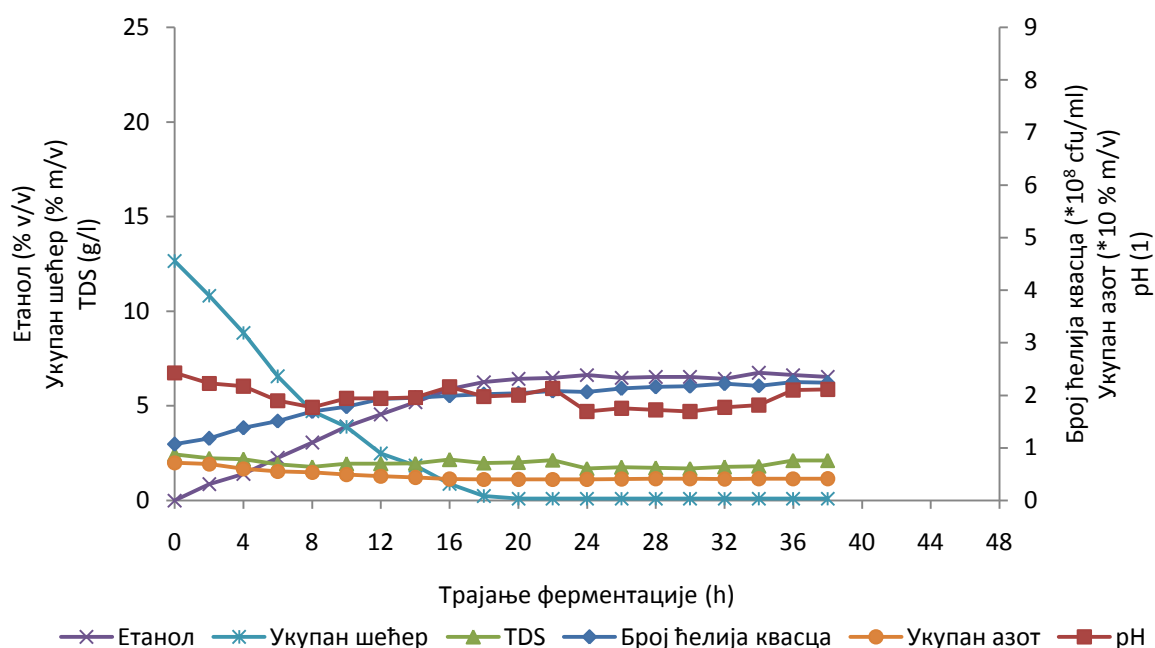
У претходним поглављима овог рада доказана је могућност производње етанола из међупроизвода технологије прераде шећерне репе и дефинисани су фактори који су од значаја за ток ферментације и који су као такви коришћени за моделовање процеса (Pоров et al., 2010; Ranković et al., 2009). Експерименти изведени са циљем дефинисања функција за одзиве броја ћелија квасца, садржаја етанола и укупног садржаја шећера су изведени у лабораторијском биореактору радне запремине 1,5 l. Постављени циљ оптимизације је био одабир почетног садржаја шећера и трајања ферментације за које ће одабрани одзив броја ћелија квасца и садржаја етанола бити максималан, а укупног садржаја шећера минималан. Метода жељене функције у комбинацији са полиномским зависностима посматраних одзива је примењена за дефинисање оптималних вредности почетног садржаја шећера и трајања ферментације.

Ферментације екстракционог, ретког и густог сока, као и меласе при дефинисаним оптималним условима су изведене у лабораторијском биореактору радне запремине 10 l. Циљ ових експеримената је валидација добијених резултата, односно провера њихове примењивости у увећаним размерама. Током ферментације у увећаним размерама, анализа ферментационог медијума је вршена на свака 2 h, рачунато од момента инокулације, ради дефинисања кинетике.

5.5.1. Кинетика ферментације екстракционог сока у увећаним размерама

Оптималне вредности варираних параметара, при којим жељена функција има највећу вредност, су почетни садржај шећера 12,71% m/v и трајање ферментације 38 h. Са циљем валидације добијених математичких модела, који се односе на ферментацију екстракционог сока, изведен је експеримент у увећаним размерама при дефинисаним оптималним условима у три понављања.

На Слици 37 је приказана промена уобичајених показатеља тока култивације током 38 h ферментације екстракционог сока са дефинисаним оптималним почетним садржајем шећера у увећаним размерама. Вредности показатеља тока ферментације приказане на графику представљају средњу вредност резултата добијених у три ферментације поновљене под истим условима.



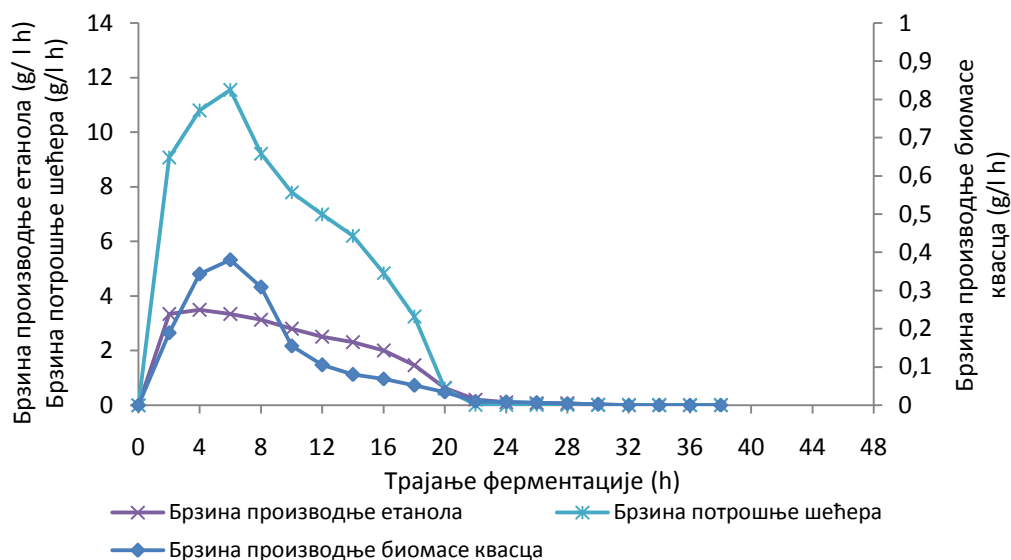
Слика 37: Ток ферментације екстракционог сока у увећаним размерама

Вредности посматраних одзива по истеку предвиђеног трајања ферментације су дате у Табели 25. Након 38 h ферментације хранљиве подлоге на бази екстракционог сока у увећаним размерама, средња вредност садржаја етанола износи 7,65% v/v уз стандардно одступање 0,22. Средње вредности броја ћелија квасца и укупног садржаја шећера износе $2,25 \times 10^8$ cfu/ml и 0,09% m/v, а одговарајућа стандардна одступања су 0,14 и 0,03. За оптималне вредности варираних параметара, модел предвиђа: број ћелија квасца $2,31 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 7,99% v/v и укупан садржај шећера приближно једнак нули. На основу приказаних резултата, може се уочити добро слагање експерименталних вредности са вредностима које су предвиђене моделом.

Табела 25: Вредности посматраних одзива при оптимизованим вредностима почетног садржаја шећера и трајања ферментације екстракционог сока

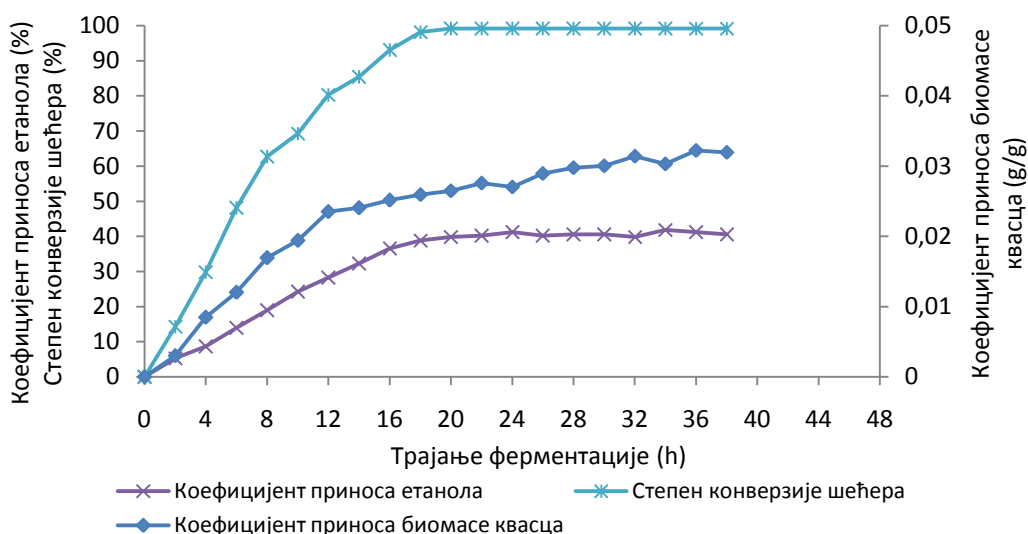
	почетни садржај шећера (% m/v)	трајање ферментације (h)	број ћелија квасца ($\times 10^8$ cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
1	12,78	38	2,18	6,67	0,09
2	12,61	38	2,41	6,43	0,12
3	12,64	38	2,16	6,46	0,07

На Слици 38 је приказана зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца, које су израчунате применом једначина 11, 8 и 1, од трајања ферментације екстракционог сока у увећаним размерама. Од момента инокулације брзина производње биомасе квасца интензивно расте и у 6 h достиже максималну вредност која износи 0,31 g/l·h. У даљем току ферментације, брзина производње биомасе квасца опада до 26 h, када достиже вредност блиску нули што коинцидира са временом почетка стационарне фазе раста (Слика 37). Брзина потрошње шећера интензивно расте до 6 h ферментације када је њена вредност максимална и износи 11,55 g/l·h. У даљем току процеса брзина потрошње шећера опада тако да у 22 h њена вредност постаје блиска нули. Брзина производње етанола достиже максималну вредност од 3,49 g/l·h већ у 4 h ферментације након чега се лагано смањује до 30 h када достиже вредност блиску нули што је очигледно последица минималне вредности укупног садржаја шећера у ферментационом медијуму (Слика 37).



Слика 38: Зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца током ферментације екстракционог сока у увећаним размерама

На Слици 39 је приказана зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца, које су израчунате применом једначина 16, 18 и 17, током ферментације екстракционог сока у увећаним размерама. На основу приказаних резултата уочава се да је пораст коефицијента приноса биомасе квасца већи у току првих 12 h ферментације након чега је изражен лагани раст овог показатеља до краја процеса. Максимална вредност коефицијента приноса биомасе квасца износи 0,032 g/g, а постигнута је у 36 h ферментације. Будући да у току свих 37 h трајања ферментације није уочено значајно смањење поменутог показатеља, може се закључити да ћелије квасца током укупног трајања процеса не улазе у фазу одумирања што је у складу са резултатима тока ферментације, који су приказани на Слици 37. Степен конверзије шећера максималну вредност од 99,24% постиже у 38 h ферментације, али је његова промена минимална већ након 22 h ферментације (Ranković et al., 2009). Промена коефицијента приноса етанола је у доброј корелацији са запаженом променом степена конверзије шећера. Наиме, коефицијент приноса етанола расте до 34 h ферментације када достиже максималну вредност од 41,88%.



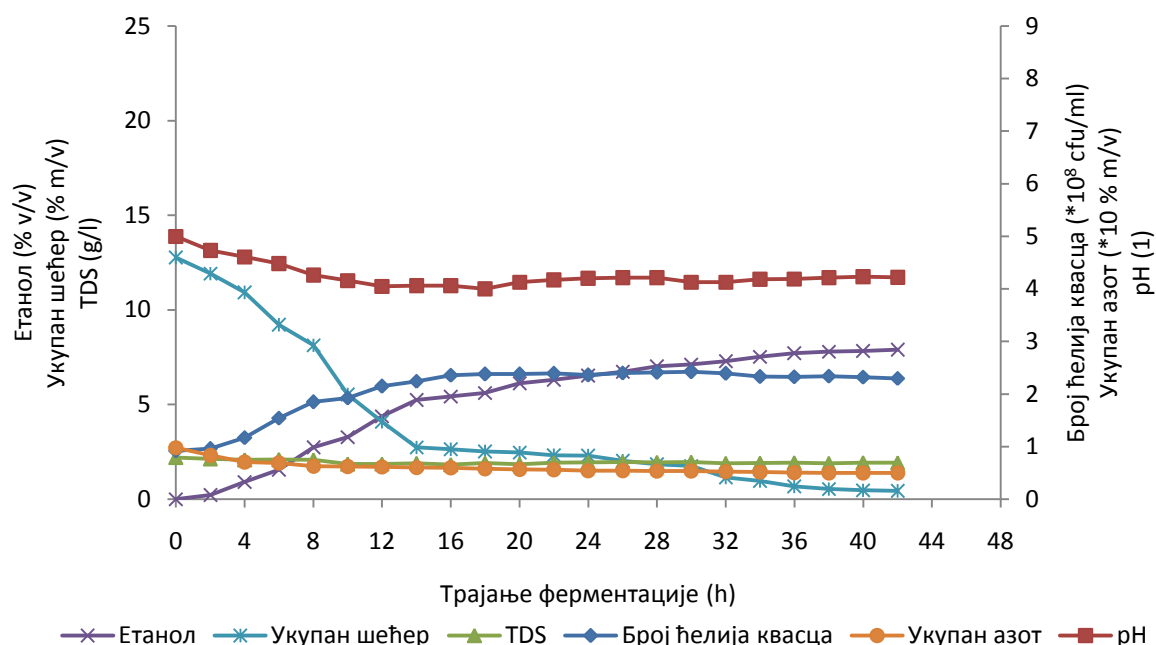
Слика 39: Зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца током ферментације екстракционог сока у увећаним размерама

Теоријски принос етанола у односу на сахарозу као извор шећера при ферментацији квасцем *Saccharomyces cerevisiae* износи 53,8%. Међутим, у пракси због утрошка дела шећера на синтезу биомасе квасца и продукцију споредних производа метаболизма, као и непотпуног издвајања етанола из ћелија производног микроорганизама, принос обично износи 80-90% у односу на теоријски (Kukić, 1995). Коефицијент приноса етанола од 41,88% који је постигнут током ферментације екстракционог сока у биореактору радне запремине 10 л под примењеним експерименталним условима износи 77,84% у односу на теоријски принос. Познато је да различити фактори као што је вредност рН или осмотски притисак у великој мери могу да утичу на фаворизацију метаболичких путева којима настају споредни производи ферментације при чему долази до минимизације продукције етанола из шећера. Будући да је састав екстракционог сока веома комплексан мала је вероватноћа да сва расположива сахароза бива утрошена на синтезу биомасе квасца и етанола како то предвиђају теоријске поставке. Поред тога, дозирање антипенушавца током ферментације могло је узроковати смањену размену материја између ћелија квасца и околног медијума што такође може бити узрок мањег приноса етанола.

5.2.2. Кинетика ферментације ретког сока у увећаним размерама

Оптималне вредности варираних параметара, при којим жељена функција има највећу вредност, односно износи 1, су почетни садржај шећера 12,75% m/v и трајање ферментације 42 h. Са циљем валидације добијених математичких модела, који се односе на ферментацију ретког сока, изведен је експеримент у увећаним размерама при дефинисаним оптималним условима у три понављања.

На Слици 40 је приказана промена уобичајених показатеља тока култивације током 42 h ферментације ретког сока са дефинисаним оптималним почетним садржајем шећера у увећаним размерама. Вредности показатеља тока ферментације приказане на графику представљају средњу вредност резултата добијених у три ферментације поновљене под истим условима.



Слика 40: Ток ферментације хранљиве подлоге на бази ретког сока у увећаним размерама

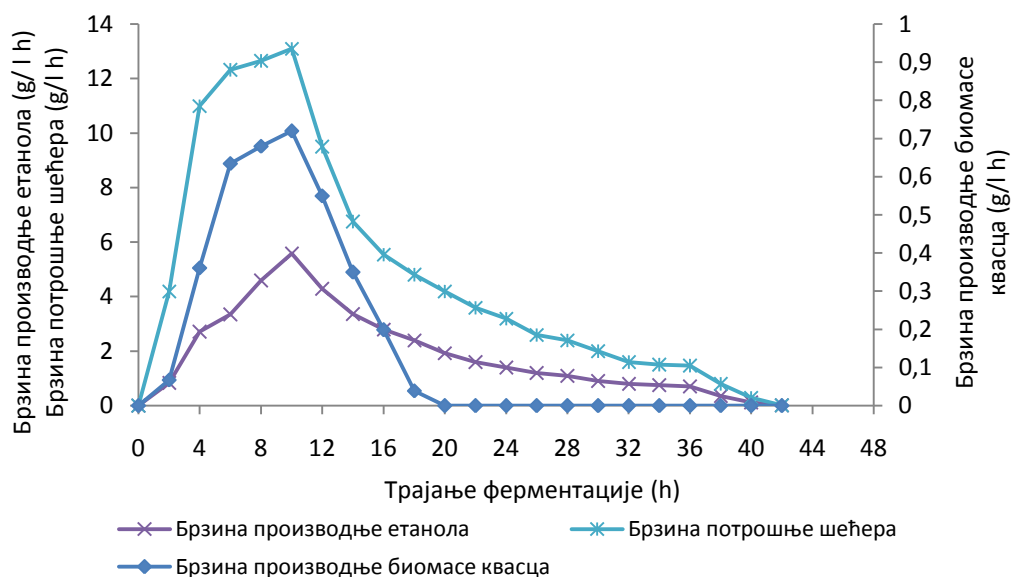
Вредности посматраних одзива по истеку предвиђеног трајања ферментације су дате у Табели 26. Након 42 h ферментације хранљиве подлоге на бази ретког сока у увећаним размерама, средња вредност садржаја етанола износи 7,78% v/v при чему је вредност стандардног одступања 0,09.

Средње вредности броја ћелија квасца и укупног садржаја шећера износе $2,33 \times 10^8$ cfu/ml и 0,26% m/v, а одговарајућа стандардна одступања су 0,07 и 0,21. За оптималне вредности варираних параметара, моделом су предвиђене следеће вредности оптимизованих одзива: број ћелија квасца $2,27 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 8,01% v/v и укупан садржај шећера 0,03 % m/v. На основу приказаних резултата, може се уочити добро слагање експерименталних вредности са вредностима које су предвиђене моделом.

Табела 26: Вредности посматраних одзива при оптимизованим вредностима почетног садржаја шећера и трајања ферментације ретког сока

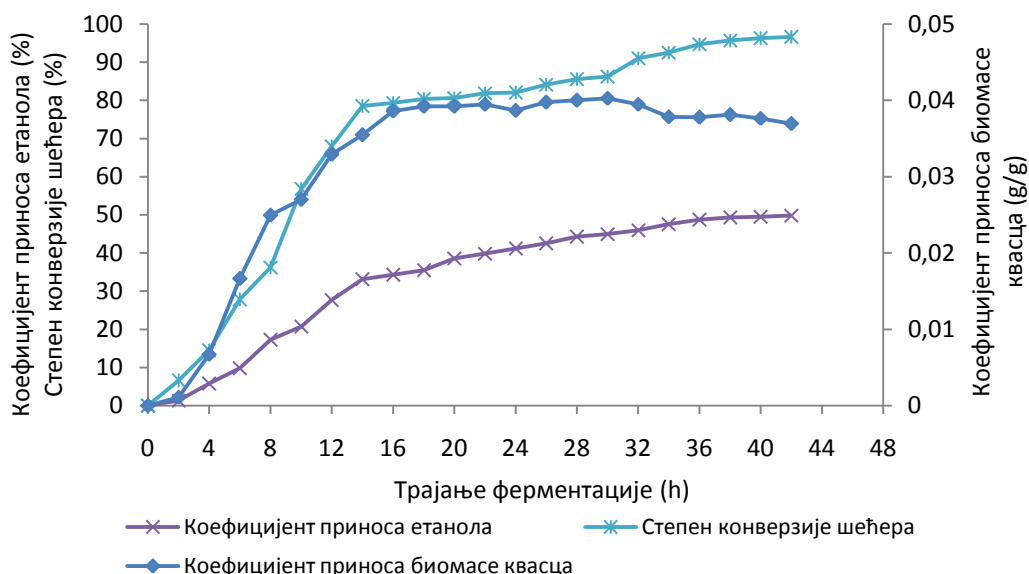
	почетни садржај шећера (% m/v)	трајање ферментације (h)	број ћелија квасца ($\times 10^8$ cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
1	12,57	42	2,39	7,56	0,49
2	12,87	42	2,26	7,87	0,21
3	12,73	42	2,35	7,91	0,07

Са Сlike 41 се може анализирати зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца, које су израчунате употребом једначина 11, 8 и 1, од трајања ферментације ретког сока у увећаним размерама. Од момента инокулације брзина производње биомасе квасца расте до 10 h када достиже максималну вредност која износи 0,72 g/l·h. Са продужетком трајања ферментације ретког сока, брзина производње биомасе квасца опада до 20 h. Занемарљиво мале вредности брзине производње биомасе квасца коиндицирају са трајањем стационарне фазе раста, која се може уочити са Сlike 40. Брзина потрошње шећера се повећава и након 10 h трајања ферментације достиже максималну вредност од 13,10 g/l·h. Након тога, брзина потрошње шећера постепено опада до краја процеса, односно тек у 42 h постаје блиска нули. Тренд промене брзине производње етанола је веома сличан, односно вредност овог показатеља тока ферментације такође расте до 10 h када достиже максималну вредност од 5,58 g/l·h. Са продужетком трајања ферментације, брзина производње етанола уједначено се смањује и тек у последњем часу ферментације достиже вредност блиску нули.



Слика 41: Зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца током ферментације ретког сока у увећаним размерама

Сликом 42 је илустрована зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца, израчунате употребом једначина 16, 18 и 17, током ферментације ретког сока у увећаним размерама. Приказани резултати указују да коефицијент приноса биомасе квасца интензивно расте током првих 18 h трајања ферментације када достиже вредност од око 0,040 g/g око које осцилује до 32 h. У даљем току ферментације се уочава пад вредности коефицијента приноса биомасе квасца, који коиндицира са уоченим смањењем броја вијабилних ћелија квасца (Слика 40). Степен конверзије шећера се брже увећава током првих 14 h трајања ферментације и у наставку процеса расте до коначне вредности од 96,65% колико износи у 42 h (Ranković et al., 2009). Коефицијент приноса етанола се увећава током укупног трајања ферментације од 42 h када постиже коначну вредност од 49,86%.



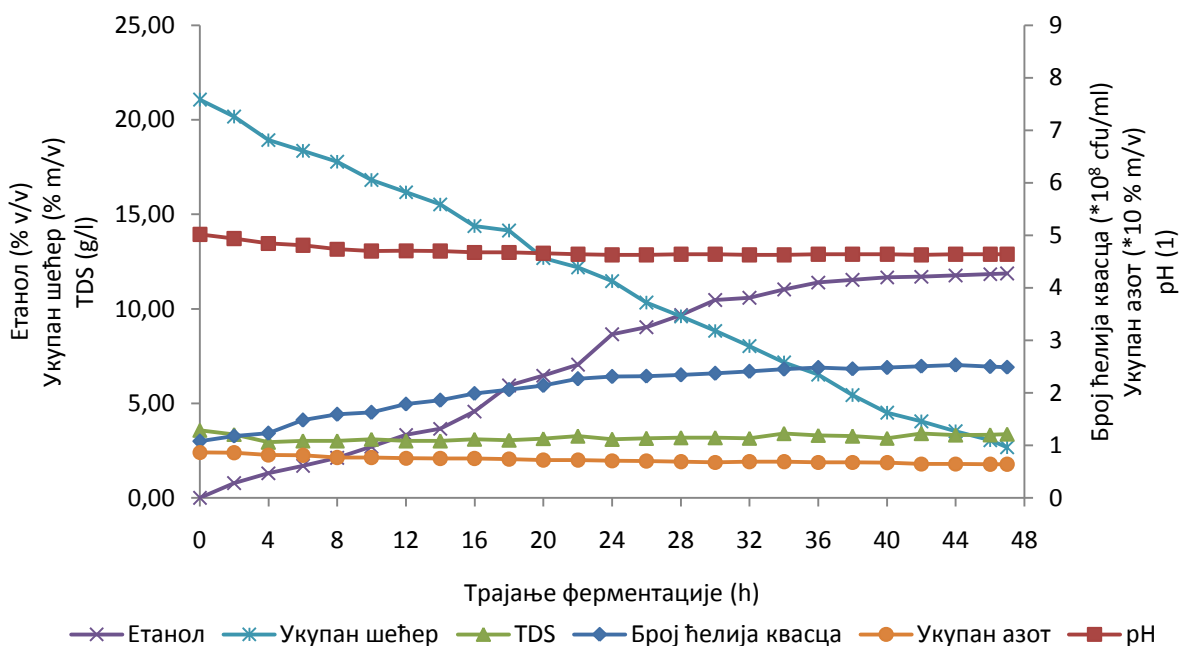
Слика 42: Зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца током ферментације ретког сока у увећаним размерама

Коефицијент приноса етанола од 49,86% који је постигнут током ферментације ретког сока у биореактору радне запремине 10 l под примењеним експерименталним условима износи 92,68% у односу на теоријски принос. Принос етанола из ретког сока у односу на случај када се као сировина примени екстракциони сок је значајно већи. Ова чињеница је у складу са очекивањима будући да ретки сок има већи квотијент чистоће у односу на екстракциони (Табеле 12 и 13). Ова карактеристика испитиваних сокова јасно указује да је ретки сок у односу на екстракциони далеко сиромашнији нешећерним компонентама које ометају ферментацију шећера у етанол. Поред тога током ферментације ретког сока не постоји потреба за дозирањем антипенушавца који може бити узрок мањег приноса етанола.

5.2.3. Кинетика ферментације густог сока у увећаним размерама

Дефинисане оптималне вредности експерименталних параметара су почетни садржај шећера 21,12% m/v и трајање ферментације 47 h. Са циљем валидације добијених математичких модела, који се односе на ферментацију густог сока, изведен је експеримент у увећаним размерама при дефинисаним оптималним условима у три понављања.

На Слици 43 је приказана промена уобичајених показатеља тока култивације током 47 h ферментације густог сока са дефинисаним оптималним почетним садржајем шећера у увећаним размерама. Вредности показатеља тока ферментације приказане на графику представљају средњу вредност резултата добијених у три ферментације поновљене под истим условима.



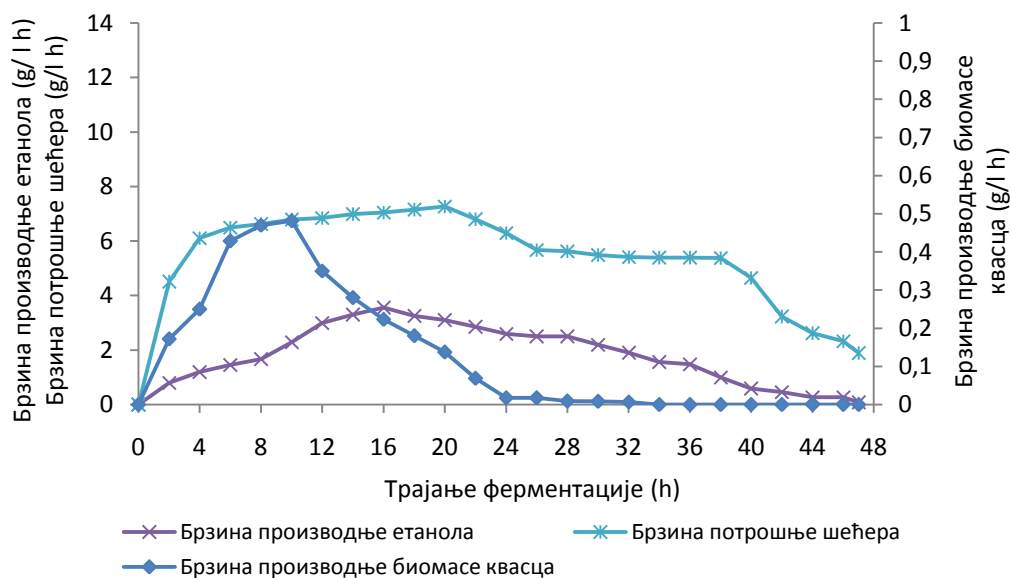
Слика 43: Ток ферментације густог сока у увећаним размерама

У Табели 27 су приказани резултати који указују на адекватно слагање експерименталних вредности са вредностима које су предвиђене моделом. Након 47 h ферментације хранљиве подлоге на бази густог сока у увећаним размерама, средња вредност садржаја етанола износи 11,09% v/v при чему је вредност стандардног одступања 0,20. Средње вредности броја ћелија квасца и укупног садржаја шећера износе $2,35 \times 10^8$ cfu/ml и 3,08% m/v, а одговарајућа стандардна одступања су 0,19 и 0,29. За оптималне вредности варираних параметара, моделом су предвиђене следеће вредности оптимизованих одзива: број ћелија квасца $2,37 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 11,38% v/v и укупан садржај шећера 3,02 % m/v. На основу приказаних резултата, може се уочити добро слагање експерименталних вредности са вредностима које су предвиђене моделом.

Табела 27: Вредности посматраних одзива при оптимизованим вредностима почетног садржаја шећера и трајања ферментације густог сока

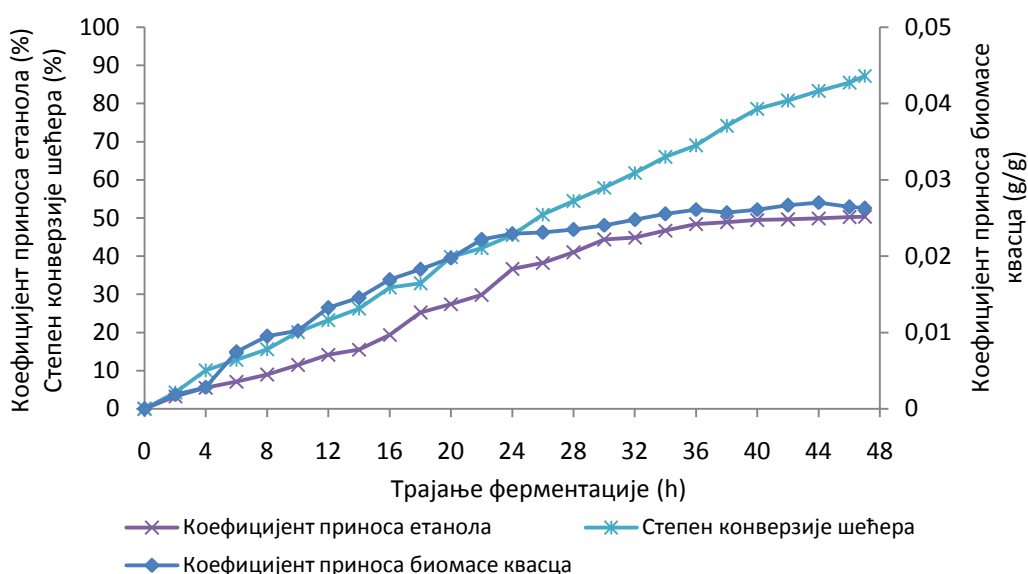
	почетни садржај шећера (% m/v)	трајање ферментације (h)	број ћелија квасца ($\times 10^8$ cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
1	21,02	47	2,56	11,31	2,82
2	21,26	47	2,31	10,94	3,40
3	21,14	47	2,19	11,01	3,01

На Слици 44 је приказана зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца, које су израчунате применом једначина 11, 8 и 1, од трајања ферментације густог сока у увећаним размерама. Брзина производње биомасе квасца се интензивно повећава током првих 10 h трајања ферментације када достиже максималну вредност од 0,48 g/l·h, након чега се смањује и у 32 h њена вредност је блиска нули у складу са почетком стационарне фазе раста (Слика 43). Пораст брзине потрошње шећера је изражен до 20 h трајања ферментације када достиже максимум од 7,28 g/l·h, а затим се смањује до вредности од 1,89 g/l·h, колико износи у последњем часу. Релативно висока вредност брзине потрошње шећера током укупног трајања ферментације је у складу са променама брзина производње биомасе и етанола. Будући да брзина производње биомасе има веома ниске вредности након 24 h, евидентно је да у том периоду брзина потрошње шећера у већој мери зависи од продукције етанола. Брзина производње етанола расте током првих 16 h трајања ферментације када достиже вредност од 3,55 g/l·h, а затим се постепено смањује до 47 h до вредности блиске нули.



Слика 44: Зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца током ферментације густог сока у увећаним размерама

На Слици 45 је приказана зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца, који су израчунати применом једначина 16, 18 и 17, током ферментације густог сока у увећаним размерама. На основу приказаних резултата се може запазити значајнији пораст коефицијента приноса биомасе до 22 h ферментације када његова вредност износи 0,022 g/g. У периоду од 22 до 44 h трајања ферментације коефицијент приноса биомасе лагано расте до максималне вредности од 0,027 g/g док у последња 3 h процеса његова вредност незнатно опада. Степен конверзије шећера се готово линеарно увећава током свих 47 h трајања ферментације што указује на изражену метаболичку активност ћелија производног микроорганизма. Максимална вредност степена конверзије шећера износи 87,29% и нижа је у односу на вредности истог кинетичког показатеља ферментације екстракционог и ретког сока што је у складу са чињеницом да у подлози на бази густог сока по истеку 47 h процеса остаје око 3% m/v неискоришћеног шећера (Слика 43). Коефицијент приноса етанола се такође увећава у целокупном току трајања ферментације и у 47 h његова вредност износи 50,34%.



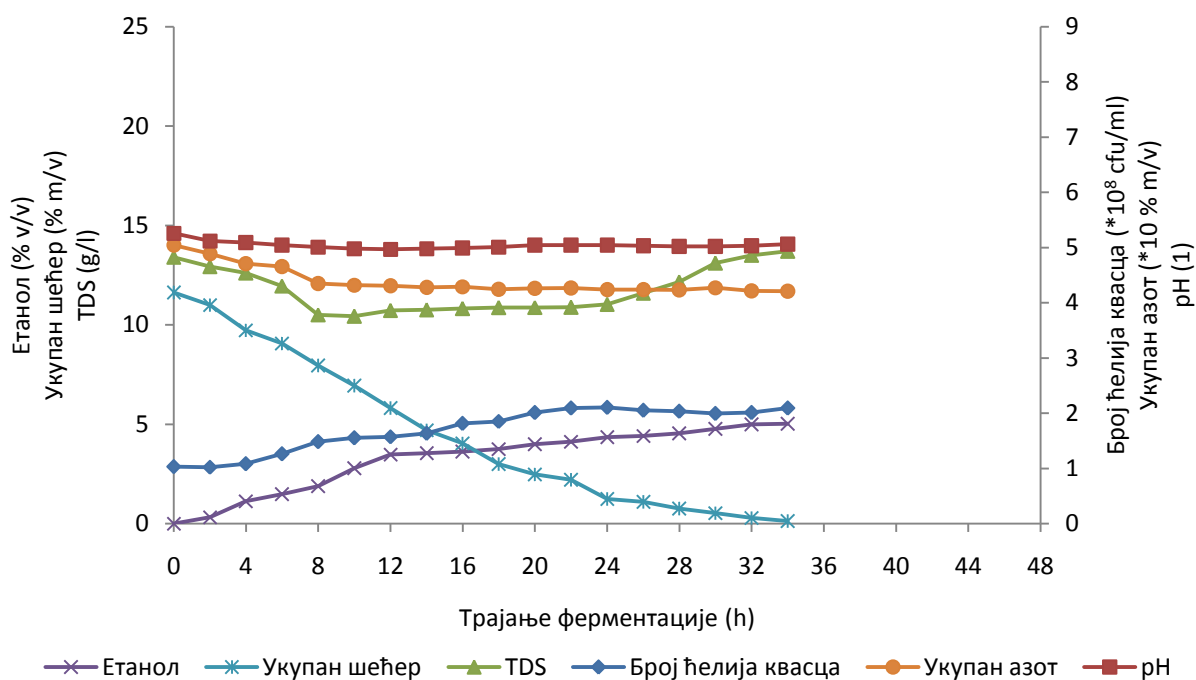
Слика 45: Зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца током ферментације густог сока у увећаним размерама

Коефицијент приноса етанола од 50,34% који је постигнут током ферментације густог сока у биореактору радне запремине 10 l под примењеним експерименталним условима износи 93,57% у односу на теоријски принос. Блиске вредности приноса етанола из густог и ретког сока су очекиване будући да се састав ова два међупроизвода технологије прераде шећерне репе битно разликује искључиво у погледу садржаја воде.

5.2.4. Кинетика ферментације меласе у увећаним размерама

У складу са наведеним, највиша вредност укупне жељене функције износи 0,829 и постигнута је при почетном садржају шећера 11,59% m/v и трајању ферментације 34 h. Са циљем валидације добијених математичких модела, који се односе на ферментацију меласе, изведен је експеримент у увећаним размерама при дефинисаним оптималним условима у три понављања.

На Слици 46 су приказане промене уобичајених показатеља тока култивације током 34 h ферментације меласе са дефинисаним оптималним почетним садржајем шећера у увећаним размерама. Вредности показатеља тока ферментације приказане на графику представљају средњу вредност резултата добијених у три ферментације поновљене под истим условима.



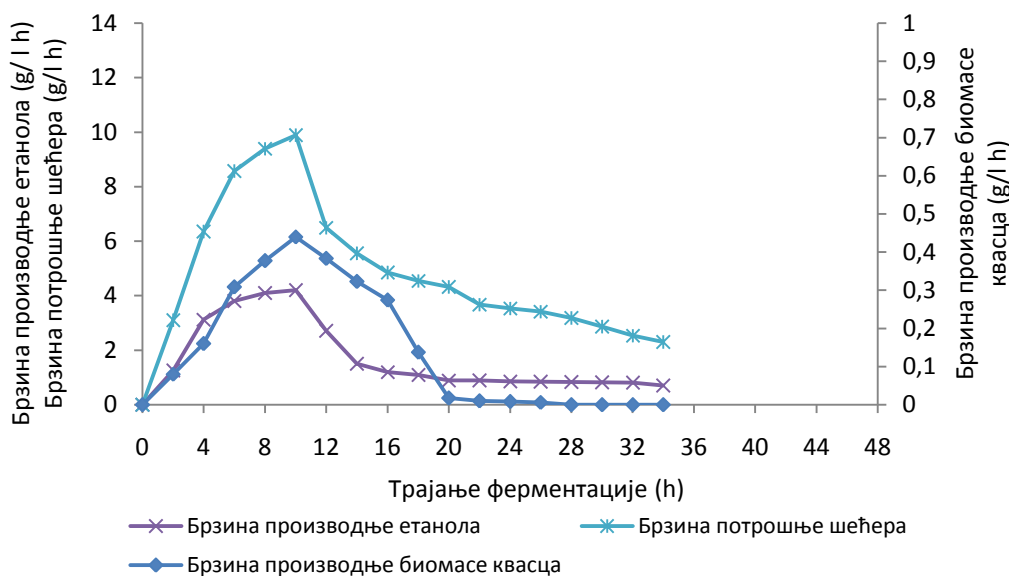
Слика 46: Ток ферментације меласе у увећаним размерама

Резултати приказани у Табели 28 указују на адекватно слагање експерименталних вредности са вредностима које су предвиђене моделом. Након 34 h ферментације хранљиве подлоге на бази меласе у увећаним размерама, средња вредност садржаја етанола износи 4,92% v/v при чему је вредност стандардног одступања 0,18. Средње вредности броја ћелија квасца и укупног садржаја шећера износе $2,08 \times 10^8$ cfu/ml и 0,08% m/v, а одговарајућа стандардна одступања су 0,17 и 0,18. За оптималне вредности варираних параметара, моделом су предвиђене следеће вредности оптимизованих одзива: број ћелија квасца $1,84 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 4,54% v/v и укупан садржај шећера је приближно једнак нули. На основу приказаних резултата, може се уочити добро слагање експерименталних вредности са вредностима које су предвиђене моделом.

Табела 28: Вредности посматраних одзива при оптимизованим вредностима почетног садржаја шећера и трајања ферментације меласе

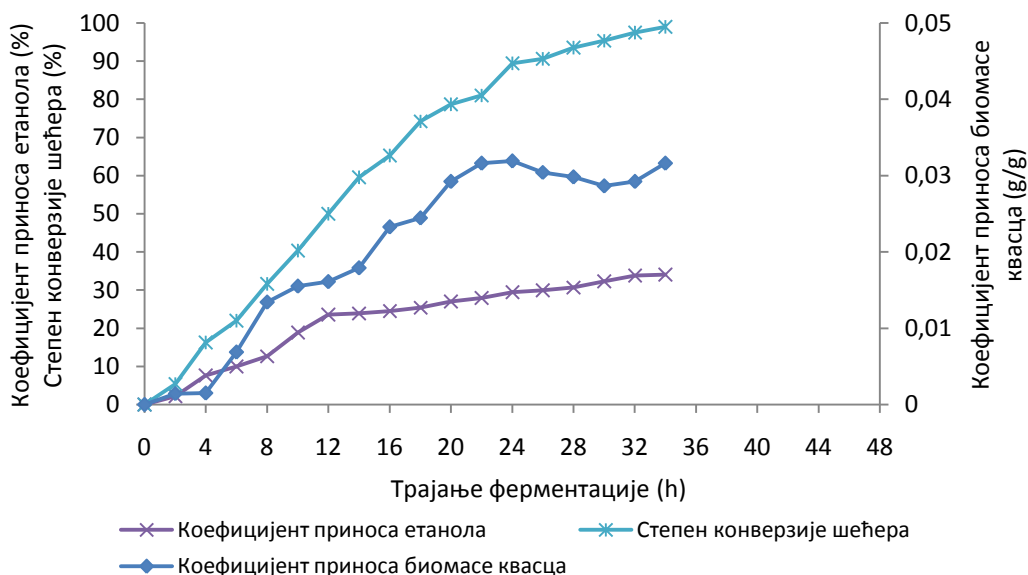
	почетни садржај шећера (% m/v)	трајање ферментације (h)	број ћелија квасца ($\times 10^8$ cfu/ml)	садржај етанола (% v/v)	укупан садржај шећера (% m/v)
1	11,92	34	1,89	13,22	0,13
2	11,34	34	2,21	13,59	0,07
3	11,65	34	2,14	13,67	0,04

Са Сликe 47 се уочава зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца, које су израчунате на основу једначина 11, 8 и 1, од трајања ферментације меласе у увећаним размерама. Брзина производње биомасе квасца расте од момента инокулације до 10 h када достиже максималну вредност од 0,44 g/l·h. У даљем току ферментације меласе, брзина производње биомасе квасца се смањује и од 26 h има вредност блиску нули. Брзина потрошње шећера се повећава и у 10 h трајања ферментације достиже максималну вредност од 9,89 g/l·h. Након тога, брзина потрошње шећера постепено опада и у 34 h процеса износи 2,3 g/l·h. Динамика промене брзине производње етанола је веома слична, односно вредност и овог показатеља тока ферментације расте до 10 h када достиже максималну вредност од 4,21 g/l·h. У даљем току процеса, брзина производње етанола се значајније смањује до 14 h, а затим се лагано смањује до истека 34 h.



Слика 47: Зависност брзине производње етанола, брзине потрошње шећера и брзине производње биомасе квасца током ферментације меласе у увећаним размерама

На Слици 48 је приказана зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца, који су израчунати применом једначина 16, 18 и 17, током ферментације меласе у увећаним размерама. Добијени резултати указују да коефицијент приноса биомасе квасца расте током прва 24 h трајања ферментације када достиже вредност од 0,032 g/g. У даљем току процеса овај кинетички показатељ варира у малом опсегу вредности. Степен конверзије шећера значајно расте у укупном трајању процеса по завршетку којег достиже максималну вредност од 98,97% (Ranković et al., 2009). Бржи пораст степена конверзије супстрата у прва 24 h трајања ферментације је последица интензивног раста и продукције етанола у том периоду. У периоду између 24 и 34 h процеса пораст биомасе је занемарљив па је готово целокупна потрошња супстрата последица продукције етанола. Коефицијент приноса етанола се увећава током укупног трајања ферментације и постиже коначну вредност од 34,05% у 34 h.



Слика 48: Зависност коефицијента приноса етанола, степена конверзије шећера и коефицијента приноса биомасе квасца током ферментације меласе у увећаним размерама

Коефицијент приноса етанола од 34,05% који је постигнут током ферментације меласе у биореактору радне запремине 10 l под примењеним експерименталним условима износи 63,29% у односу на теоријски принос. Будући да је састав меласе комплексан, а концентрације различитих нешећерних компоненти веома високе чак и када се ова сировина разблажи теко да садржи око 11,5% шећера, нижи принос етанола у односу на уобичајене вредности је вероватно последица инхибиције метаболизма производног микроорганизама повишеним осмотским притиском.

6. ЗАКЉУЧАК

Истраживања која су обухваћена овом дисертацијом извршена су у потпуности уз коришћење сировинске базе доступне на нашем тржишту. Добијени резултати могу се резимирати у оквиру следећих закључака:

Резултати анализе састава сировина указују да екстракциони, ретки и густо сок као међупроизводи и меласа као нуспроизвод технологије прераде шећерне репе имају уобичајен састав за процес прераде у домаћим шећеранама. Наведени супстрати, на основу садржаја сахарозе, укупног азота и пепела, представљају погодну сировину за припрему хранљиве подлоге за производњу етанола.

Ток ферментације испитан је на основу следећих показатеља: број ћелија квасца, укупан садржај шећера, садржај укупног азота, укупан садржај растворених соли, вредност рН и садржај етанола. Вредности испитиваних показатеља тока ферментације подлога на бази екстракционог, ретког и густог сока, као и меласе, помоћу пет различитих стартер култура квасца доступних на домаћем тржишту по истеку 48 h процеса, статистички су обрађене анализом варијансе. Аритметичке средине су упоређене *Scheffe*-овим тестом при нивоу значајности $p=0,05$. Добијени резултати указују да нема статистички значајне разлике у погледу састава ферментисаних полого добијених метаболичком активношћу квасца за производњу јаких алкохолних пића, два квасца за производњу вина и два пекарска квасца под примењеним експерименталним условима.

Експериментално је потврђена изводљивост добијања етанола дисконтинуалном ферментацијом екстракционог, ретког и густог сока као и меласе из домаћих фабрика шећера квасцем *Saccharomyces cerevisiae* у биореактору радне запремине 1,5 l. Припрема за ферментацију коју захтевају све испитане сировине је корекција вредности рН и стерилизација. Код густог сока и меласе претходно је потребно извршити разблажење. Недостатак екстракционог сока са аспекта вођења процеса ферментације је садржај сапонина, који изазивају пењење током ферментације што изискује дозирање антипенушавца.

На добијање етанола ферментацијом утиче велики број фактора. Анализа тока ферментације у биореактору радне запремине 1,5 l извршена је са циљем дефинисања фактора који имају највећи утицај. На основу приказаних резултата испитивања тока ферментације подлога на бази међу- и нуспроизвода технологије прераде шећерне репе утврђено је да након 48 h ферментације подлога које су припремљене разблаживањем екстракционог, ретког и густог сока као и меласе до почетног садржаја шећера у опсегу 5-25% m/v преостаје извесна количина неискоришћеног азота и растворених соли. Резултати показују да све примењене подлоге садрже довољну количину ових нутријената за метаболичку активност квасца током алкохолне ферментације. Утврђено је да се вредност рН током трајања ферментације свих примењених хранљивих подлога мења у опсегу 3,5-6,0 у којем квасци могу ефикасно да производе етанол. Садржај азота, укупан садржај растворених соли и вредност рН не представљају лимитирајуће факторе за одвијање кинетике процеса при примењеним експерименталним условима. Као одзиви за моделовање дефинисани су следећи показатељи тока ферментације: број ћелија квасца, укупан садржај шећера и садржај етанола у ферментационој течности.

Моделовање има за циљ дефинисање оптималних вредности почетног садржаја шећера и трајања ферментације екстракционог, ретког и густог сока као међупроизвода и меласе као нуспроизвода технологије прераде шећерне репе у примењеним експерименталним условима применом методе жељене функције у комбинацији са полиномским зависностима посматраних одзива. У циљу постизања максималног приноса етанола током ферментације међу- и нуспроизвода технологије прераде шећерне репе, број ћелија квасца и садржај етанола треба да буду максимални, док укупан садржај шећера треба да буде минималан. Њихове индивидуалне жељене функције треба да имају што већу вредност, идеално 1.

За опис одзивних функција броја ћелија квасца, садржаја етанола и укупног садржаја шећера током ферментације подлоге на бази екстракционог сока испитан је утицај почетног садржаја шећера у опсегу 5-13% m/v и трајања ферментације у опсегу 0-48 h. Високе вредности коефицијената детерминације у опсегу 0,904-0,954 указују на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда. Модели полинома другог реда свих посматраних одзива су значајни при нивоу значајности 95% (p -вредност 0,05). За екстракциони сок оптималне вредности варираних параметара, при којим жељена функција има највећу вредност су почетни садржај шећера 12,71% m/v и трајање ферментације 38 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $2,31 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 7,99% v/v и укупан садржај шећера приближно једнак нули.

За опис одзивних функција броја ћелија квасца, садржаја етанола и укупног садржаја шећера, испитан је утицај почетног садржаја шећера у подлози на бази ретког сока у опсегу 5-13% m/v и трајања ферментације у опсегу 0-48 h. Коефицијенти детерминације моделованих одзива за ток ферментације ретког сока се налазе у опсегу 0,875-0,975. Анализа варијансе за посматране одзиве указује да су сви модели статистички значајни при нивоу значајности 95% (p -вредност 0,05). За ретки сок оптималне вредности варираних параметара, при којим жељена функција износи 1, су почетни садржај шећера 12,75% m/v и трајање ферментације 42 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $2,27 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 8,01% v/v и укупан садржај шећера 0,03 % m/v .

За опис одзивних функција броја ћелија квасца, садржаја етанола и укупног садржаја шећера током ферментације подлоге на бази густог сока, испитан је утицај почетног садржаја шећера у опсегу 5-25% m/v и трајања ферментације у опсегу 0-48 h. Релативно високе вредности коефицијената детерминације у опсегу 0,866-0,960 указују на адекватно фитовање експерименталних резултата полиномом другог реда. Модели полинома другог реда свих посматраних одзива су значајни при нивоу значајности 95%. Дефинисане оптималне вредности варираних параметара за густо сок су почетни садржај шећера 21,12% m/v и трајање ферментације 47 h, за које су вредности оптимизованих одзива следеће: број ћелија квасца $2,37 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 11,38% v/v и укупан садржај шећера 3,02 % m/v .

За опис одзивних функција броја ћелија квасца, садржаја етанола и укупног садржаја шећера током ферментације подлога на бази меласе је испитан утицај почетног садржаја шећера у опсегу 5-25% m/v и трајања ферментације у опсегу 0-48 h. Коефицијенти детерминације моделованих одзива за ток ферментације подлоге на бази меласе се налазе у опсегу 0,615-0,954. Анализа варијансе за посматране одзиве указује да су сви модели статистички значајни при нивоу значајности 95% (p -вредност 0,05). За меласу су дефинисане следеће оптималне вредности варираних параметара: почетни садржај шећера 11,59% m/v и трајање ферментације 34 h. За наведене вредности варираних параметара вредности оптимизованих одзива су следеће: број ћелија квасца $1,84 \times 10^8$ cfu/ml, садржај етанола 4,54% v/v и укупан садржај шећера је приближно једнак нули.

Резултати тока ферментације подлоге на бази екстракционог сока у биореактору радне запремина 10 l, при оптималним условима дефинисаним за ферментацију у биореактору радне запремине 1,5 l, су садржај етанола 7,65% v/v, број ћелија квасца $2,25 \times 10^8$ cfu/ml и укупан садржај шећера 0,09% m/v. Ови резултати су у доброј корелацији са горенаведеним вредностима оптимизованих одзива које су предвиђене моделом. По истеку ферментације подлоге на бази ретког сока биореактору радне запремина 10 l, при оптималним условима дефинисаним за ферментацију у биореактору радне запремине 1,5 l, вредности посматраних одзива су садржај етанола 7,78% v/v, број ћелија квасца $2,33 \times 10^8$ cfu/ml и укупан садржај шећера 0,26% m/v. Слагање ових експерименталних резултата са горенаведеним вредностима које су предвиђене моделом је задовољавајуће. Вредности посматраних одзива добијене током ферментације густог сока у биореактору радне запремина 10 l, при оптималним условима дефинисаним за ферментацију у биореактору радне запремине 1,5 l, су за садржај етанола 11,09% v/v, за број ћелија квасца $2,35 \times 10^8$ cfu/ml и за укупан садржај шећера 3,08% m/v. Добијене вредности се слажу са вредностима које су предвиђене моделом. Експериментално добијене вредности испитиваних одзива по истеку ферментације подлоге на бази меласе у биореактору радне запремина 10 l, при оптималним условима дефинисаним за ферментацију у биореактору радне запремине 1,5 l, износе 4,92% v/v, $2,08 \times 10^8$ cfu/ml и 0,08% m/v за садржај етанола, број ћелија квасца и укупан садржај шећера, респективно. И ове вредности су у адекватној корелацији са вредностима које су предвиђене моделом што за све примењене подлоге указује на валидност резултата оптимизације, односно на њихову примењивост у увећаним размерама.

Током ферментације подлоге на бази екстракционог сока у биореактору радне запремина 10 l максимална вредност коефицијента приноса етанола је постигнута у 34 h ферментације када износи 41,88%, док су максималне вредности коефицијента приноса биомасе квасца у износу од 0,032 g/g и степена конверзије шећера у износу од 99,24% постигнуте у 36 h и 38 h ферментације, респективно. Ферментацијом подлоге на бази ретког сока, максималне вредности коефицијента приноса етанола и степена конверзије шећера постигнуте су у 42 h ферментације и износе 49,86% и 96,65%, респективно, док коефицијент приноса биомасе квасца осцилује око максималне вредности од 0,040 g/g у периоду између 18-30 h ферментације. Коефицијент приноса биомасе квасца током ферментације подлоге на бази густог сока расте до 44 h ферментације, када достиже максималну вредност од 0,027 g/g док се максималне вредности коефицијента приноса етанола и степена конверзије шећера постижу у 47 h процеса и износе 50,34% и 87,29%, респективно. Ферментације подлоге на бази меласе у биореактору радне запремина 10 l коефицијент приноса биомасе квасца између 24-34 h ферментације осцилује око максималне вредности од 0,032 g/g, док се максималне вредности коефицијента приноса етанола и степена конверзије шећера постижу у 34 h процеса и износе 34,05% и 98,97%, респективно.

7. ЛИТЕРАТУРА

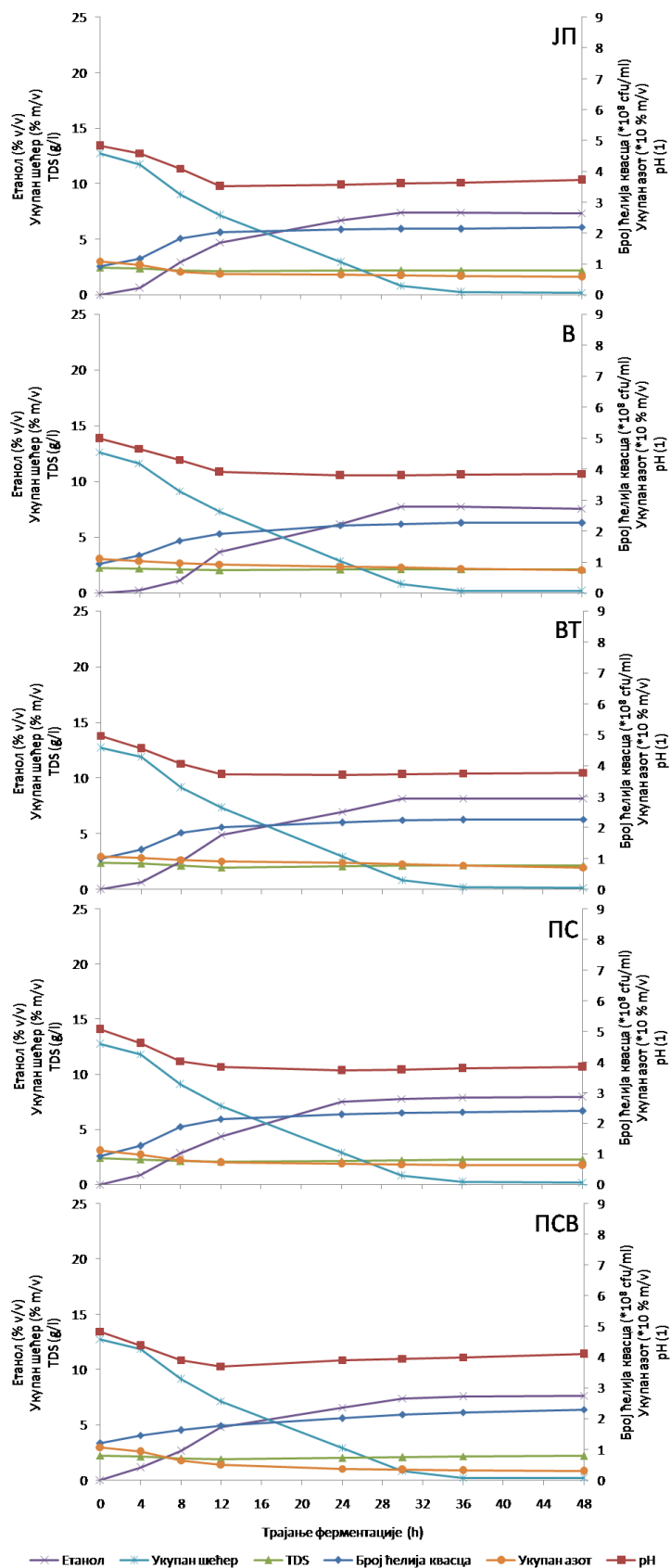
- Abdel-Fatah OM, Elsayed MA, Elshafei AM (2003): Hydrolytic cleavage of purine ribonucleosides in *Aspergillus phoenicis*. J. Basic. Microbiol. 43,439-448.
- Allen TT (2006): Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems. Springer, London.
- Bai FW, Anderson W, Moo-Young M. (2008): Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnol Adv. 26,89-105.
- Baras J, Veljković V, Popov S, Povrenović D, Lazić M, Zlatković B (2009): Osnovi bioprocenog inženjerstva, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac.
- Barnett JA (1976): The Utilization of Sugars by Yeasts, Adv. Carbohydr. Chem.Biochem. 32, 125-234.
- Barnett JA (1997): Sugar Utilization *Saccharomyces cerevisiae*; Yeast Sugar Metabolism edited by F. K. Zimmermann and K.-D. Entian, Technomic., Lancaster-Basel. 1-35.
- Bas D, Boyacı IH. Modeling and optimization I (2007): Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering. 78(3):836-45.
- Birol G, Doruker P, Kirdar B, Ilsen Önsan Z, Ülgen K. (1998) Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochemistry. 33(7):763-71.
- Bowman L, Geiger E (1984): Optimization of fermentation conditions for alcohol production. Biotechnology and Bioengineering. 26:1492-7.
- *Brereton RG (2003): Applied chemometrics for scientists. John Wiley & Sons Ltd., London.*
- Bullock GE (2002): Ethanol from Sugar Cane, Sugar Research Institute, Australia. p. 192.
- Cao JF, Gao BP, Gu WB (2006): Study on producing alcohol fermentation conditions by sweet sorghum juice. Acta Agriculturae Boreali Occidentalis Sinica, 15(3):201-3.
- Cara C, Ruiz E, Ballesteros M, Manzanares P, Negro MJ, Castro E (2008) Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. Fuel. 87(6):692-700.
- Casey GP, Ingledew WM. (1986): Ethanol tolerance in yeasts. CRC Crit Rev Biotechnol. 13,219-280.
- Chen SL (1981) Optimization of batch alcoholic fermentation of glucose syrup substrate. Biotechnol Bioeng. 23:1827-36.
- Cojocarú C, Khayet M, Zakrzewska-Trznadel G, Jaworska A (2009): Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach, J. Hazard. Mater. 167,52-63.
- Cordenunsi BR, da Silva RSF, Srivastava KC, Fabre-Sanches S, Perre MA (1985): Mathematical model for the alcoholic fermentation in batch culture: comparison between complete and incomplete factorial (3³) designs. J Biotechnol. 2:1-12.
- Cornland D, Johnson FX, Yamba F, Chidumayo EN, Morales M, Kalumiana O, Chidumayo SBM (2001): Sugarcane Resources for Sustainable Development: a Case Study in Luena, Zambia, Stockholm Environment Institute, April, ISBN: 91 88714 71 3.
- Daugulis AJ, McLellan PJE, Li JH (1997): Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis*, Biotechnology and Bioengineering, v. 56, n. 1, p. 99-105.

- Derringer G, A Balancing Act (1994): Optimizing a Products Properties. Quality Progress 27(6), 51-58.
- Design-Expert 7.1.5, пробна verzija, StatEase, Inc., USA.
- Dodic S, Popov S, Dodic J, Rankovic J, Zavargo Z, Jevtic Mucibabic R. (2009): Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. Biomass and Bioenergy. 33(5):822-7.
- Dodic SN, Popov SD, Dodic JM, Rankovic JA, Zavargo ZZ (2009): Potential contribution of bioethanol fuel to the transport sector of Vojvodina. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 13(8):2197-200.
- Dodic SN, Popov SD, Dodic JM, Rankovic JA, Zavargo ZZ (2009) Potential development of bioethanol production in Vojvodina. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 13(9):2722-7.
- Dodic SN, Vucurovic DG, Popov SD, Dodic JM, Rankovic JA (2010): Cleaner bioprocesses for promoting zero-emission biofuels production in Vojvodina. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(9):3242-6.
- Dodić S, Popov S (2009): Bioreaktori, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Dombek KM, Ingram LO (1986): Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation, Applied Environ. Microbiol. 52:975-981.
- Ergun M, Ferda Mutlu S. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology. 2000;73(3):251-5.
- Escobar JC, Lora ES, Venturini OJ, Yáñez EE, Castillo EF, Almazan O. Biofuels (2009): Environment, technology and food security. Renewable and Sustainable Energy Reviews.13(6-7):1275-87.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007): Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures, Second Edition, Springer 2007, 19-22.
- Govindaswamy S, Vane LM (2007): Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. Bioresource Technology. 98(3):677-85.
- Graves T, Narendranath NV, Dawson K, Power R. (2006): Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. J Ind Microbiol Biot. 33, 469-474.
- Hempelmann R (2007) Innovative flexible sugar/bioethanol production: the point of view of an equipment supplier. Zuckerindustrie, 132(9): 698–703.
- Henke S, Bubnik Z, Hinkova A, Pour V (2006): Model of a sugar factory with bioethanol production in program Sugars. Journal of Food Engineering 77, 416–420.
- Herlich K, editor (1990): Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington, VAA: AOAC.
- Hinková A, Bubník Z (2001): Sugar beet as a raw material for bioethanol production. Czech J Food Sci. 19,224-234.
- Hinkova A, Bubnik Z, Šarhova H, Pour V, Kadlec P (2000): Storage of sugar beet raw juice. Chez J. Food Sci., 18:14-22.
- Hoogerheide J.C. (1971): On a disturbance of the normal Pasteur reaction in baker's yeast, Antonie van Leeuwenhoek 37(4): 435-448.
- Huang H, Ramaswamy S, Tschirner UW, Ramarao BV (2008): A review of separation technologies in current and future biorefineries. Sep Purif Technol. 62,1-21.
- Ingledew WM (1999): Alcohol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: A Yeast Primer. In: *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Jokić A (2010): Modelovanje "cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Jokić A, Zavargo Z, Šereš Z, Tekić M (2010): The effect of turbulence promoter on cross-flow microfiltration of yeast suspensions: A response surface methodology approach. J Membrane Sci. 15,269-278.
- Jones AM, Ingledew WM (1994): Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. Process Biochem. 29:483–8.
- Jones AM, Ingledew WM (1994): Fuel alcohol production: assessment of selected commercial proteases for very high gravity wheat mash fermentation. Enzyme Microb Technol. 16:683–7.

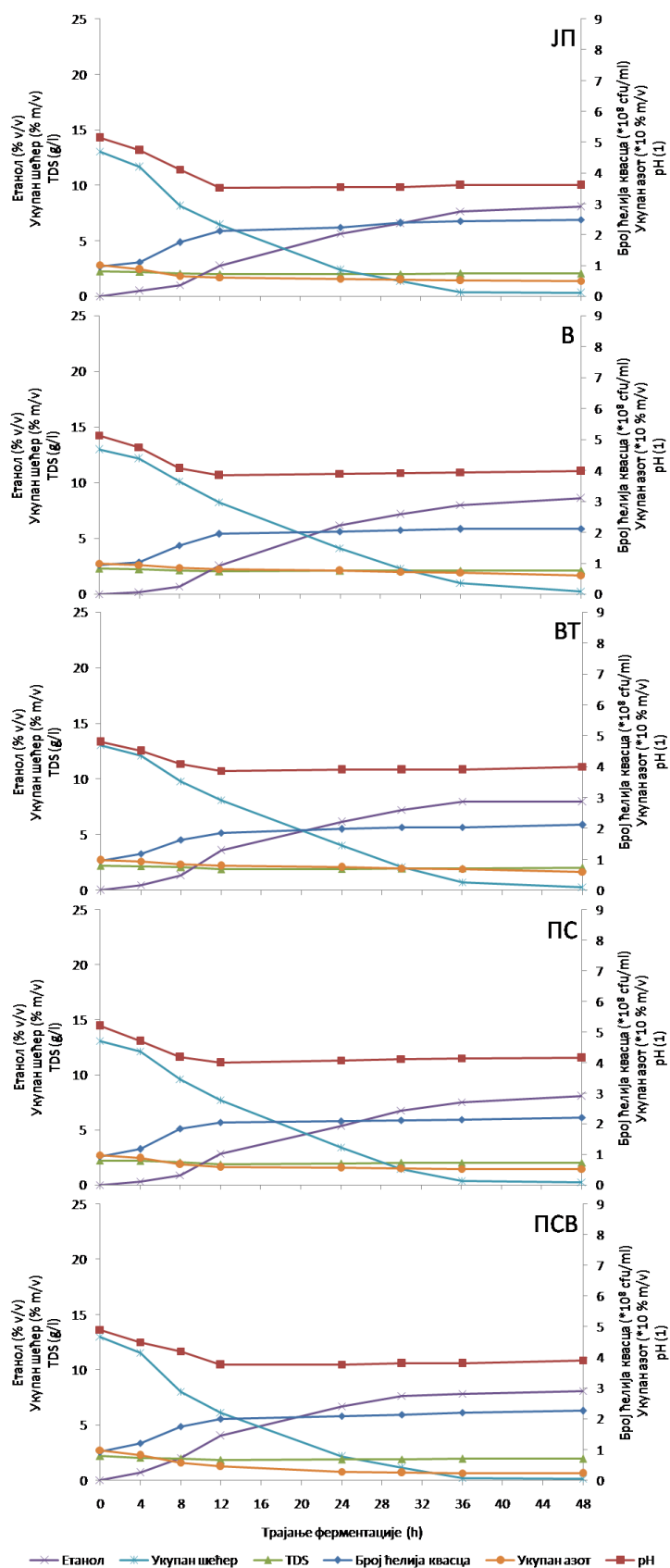
- Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI (2000): Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*. 35(6):539-50.
- Khayet M, Cojocar C, Zakrzewska-Trznadel G (2008): Response surface modelling and optimization in pervaporation. *J Membrane Sci.* 321,272–283.
- Kirsop BH (1982): Developments in beer fermentation. In: Wiseman A, editor. *Topics in enzyme and fermentation technology*, vol 6. Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd. 1982;79-131.
- Knauf M, Kraus K (2006): Specific yeasts developed for modern ethanol production, *Sugar Industry*, vol. 131, pp. 753-758.
- Krajnc D, Glavič P (2009): Assessment of different strategies for the co-production of bioethanol and beet sugar. *Chem Eng Res Des.* 87,1217-1231.
- Kukić G. (1995) *Melasa, Osnovi tehnologije šećera*, 2. knjiga, editor Šušić, S., Industrija šećera SR Jugoslavije »Jugošećer«, Beograd.
- Kumar S, Singh N, Prasad R. (2010): Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14(7):1830-44.
- Laopaiboon L, Nuanpeng S, Srinophakun P, Klanrit P, Laopaiboon P (2009): Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technol.* 100,4176-4182.
- Lazić ZR (2004): *Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Leiper KA, Schlee C, Tebble I, Stewart GG (2006): The fermentation of beet sugar syrup to produce bioethanol, *J Inst Brew* 112, 122–133.
- Liberge R, Colinart P, Fessier P, Renon H (1994): Data and model for progressive fouling in cross-flow microfiltration of yeast on three industrial mineral membranes, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 33, 1310–1318.
- Lučić R. (1987): *Proizvodnja jkakah alkoholnih pića*, Nolit, Beograd
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000): *Nutrition and metabolism. Brock biology of microbiology*. 9th ed. NJ: Prentice-Hall.
- Marchetti R, Guerzoni ME (1991): Study on the effects of selected mineral nutrients and interactions on the yeast fermentation performance. Use of an experimental design. *Cerevisia Biotechnol.* 16:24–33.
- McDonald VR (1963): Direct microscopic technique to detect viable yeast cells in pasteurised orange drink. *J Food Sci.* 28,135–139.
- McLellan PJ, Daugulis AJ, Li J (1999): The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Prog.* 15:667–80.
- Milić M, Karadžić V, Obradović S (1992): *Metode za laboratorijsku kontrolu procesa proizvodnje fabrika šećera*, Novi Sad.
- Miller GL (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Mojović Lj., Pejin D., Lazić M (2007): *Bioetanol kao gorivo-Stanje i perspektive*, Monografija, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac.
- Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM (2001): Acetic acid and lactic acid inhibition growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59:187-194
- Pejin D (1989): *Tehnologija pekarskog kvasca*, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Popov S, Ranković J, Dodić J, Dodić S, Jokić A (2010): Bioethanol Production from Raw Juice as Intermediate of Sugar Beet Processing: A Response Surface Methodology Approach, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3) 376–383.
- Ranković J, Dodić C, Popov S, Dodić J (2008): Međuproizvodi prerade šećerne repe kao podloga za biosintezu etanola, *Acta Agriculturae Serbica*, Vol. XIII, 47-54.
- Ranković J, Dodić J, Dodić S, Popov S, Jevtić-Mučibabić R (2009): Thin juice from sugar beet processing as medium for bioethanol production, *Zbornik Tehnološkog fakulteta u Leskovcu*, 19: 44-51.
- Ranković, J. (2007): *Ispitivanje primene međuproizvoda prerade šećerne repe za proizvodnju bioetanol*, Master rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

- Ranković, J., Dodić, J., Dodić, S., Popov, S. (2009): Bioethanol Production from Intermediate Products of Sugar Beet Processing with Different Types of *Saccharomyces cerevisiae*, CI&CEQ, 15 (1), 13-16.
- Rezzoug SA, Capart R (2003): Assessment of wood liquefaction in acidified ethylene glycol using experimental design methodology. *Energ. Convers. Manage.* 44,781–792.
- Rivera EC, Costa AC, Atala DIP, Maugeri F, Maciel MRW, Filho RM (2006): Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect to temperature. *Process Biochem.* 41,1682-1687.
- Roehr M (2001): *The Biotechnology of Ethanol, Classical and Future Applications.* Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Shuler ML, Kargi F (2002): *Bioprocess Engineering, Basic Concept*", Prentice Hall, Upper Saddle River.
- *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water* (1998): APHA, AWWA, WEF, 22th Edition, Washington D.C.
- STATISTICA (Data Analyses Software System) v. 9.1, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA (2010) (www.statsoft.com).
- Šušić S, Petrov S, Kukić G, Sinobad V, Perunović P, Koronovac B, Bašić Đ (1994): *Osnovi tehnologije šećera*, Industrija šećera SR Jugoslavija „Jugošećer“, Beograd.
- Thatipamala R, Rohani S, Hill GA (1992): Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 40,289-297.
- Thomas KC, Ingledew WM (1992): Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *J Ind Microbiol.* 10:61–8.
- Tian Y, Zhao L, Meng H, Sun L, Yan J (2009): Estimation of un-used land potential for biofuels development in (the) People's Republic of China. *Applied Energy.* 86;577-585.
- Turhan I, Bialka KL, Demirci A, Karhan M (2010): Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.* 2010;101,5290-5296.
- *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2003): Sixth completely revised edition, Vol 12, Wiley-VCH Verlag.
- van der Poel PW, Schiweck H, Schwartz T (1998): *Sugar Technology* Verlag Dr. Bartens KG, Berlin.
- Walker GM (1997): *Yeast Physiology and Biotechnology.* John Wiley and Sons, Chichester.
- Wang R, Ji Y, Melikoglu M, Koutinas A, Webb C (2007): Optimization of Innovative Ethanol Production from Wheat by Response Surface Methodology. *Process Safety and Environmental Protection.* 85(5):404-12.
- Weusthuis, R.A. (1994): *Disaccharide fermentation by yeasts*, Proefschrift, Technische Universiteit Delft, Delft.
- Wyman E. (1996); *Handbook on Bioethanol. Production and Utiliyation.*, Taylor&Francis, Washington DC.
- Yalçın SK, Özbas ZY (2004): Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochemistry.* 39(10):1285-91.
- Yu J, Zhang X, Tan T (2009): Optimization of media conditions for the production of ethanol from sweet sorghum juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioenerg.* 521-526.
- Zavargo Z, Popov S, Dodić S, Razmovski R, Tomanović R, Dodić J, Jokić A (2008) *Mogućnosti razvoja proizvodnje i primene bioetanolu u autonomnoj pokrajini vojvodini*, Studija, Novi Sad.
- www.BestEnergy.com

8. ПРИЛОЗИ

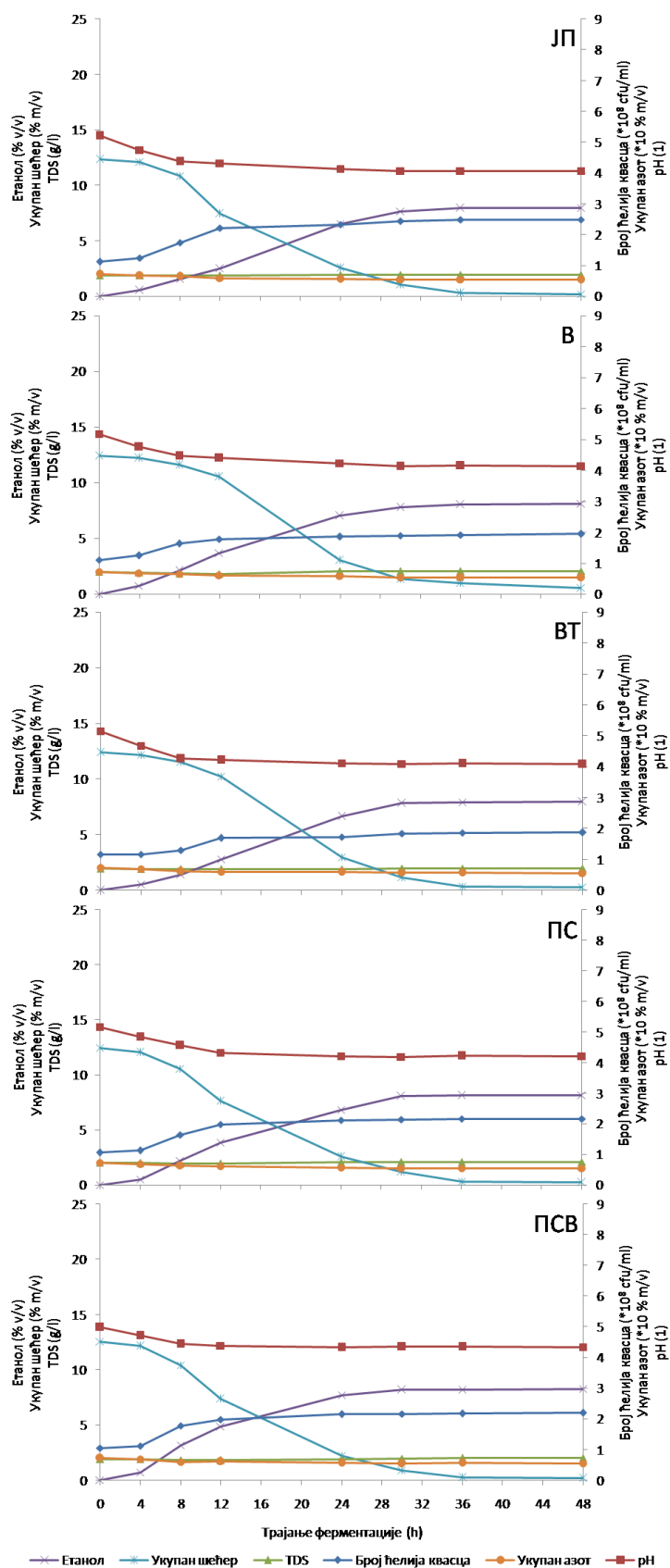


Слика П.1. Ток ферментације хранљивих подлога на бази екстракционог сока применом различитих типова квасца
 ЈП-суви квасац за производњу јаких алкохолних пића, В-суви вински квасац, ВТ-суви вински квасац
 толерантан на повишен садржај етанола, ПС-свежи пекарски квасац и ПСВ-суви пекарски квасац



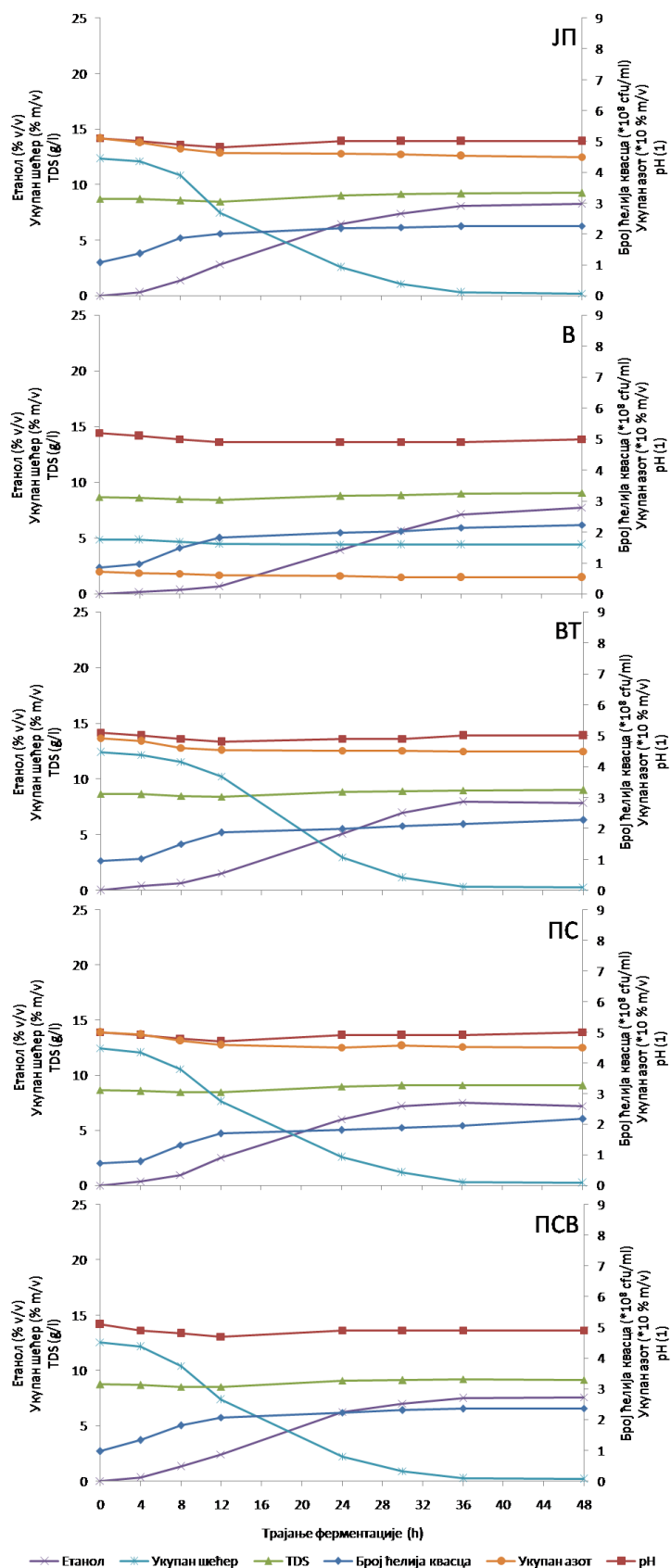
Слика П.2. Ток ферментације хранљивих подлога на бази ретког сока
применом различитих типова квасца

ЈП-суви квасац за производњу јаких алкохолних пића, В-суви вински квасац, ВТ-суви вински квасац
толерантан на повишен садржај етанола, ПС-свежи пекарски квасац и ПСВ-суви пекарски квасац



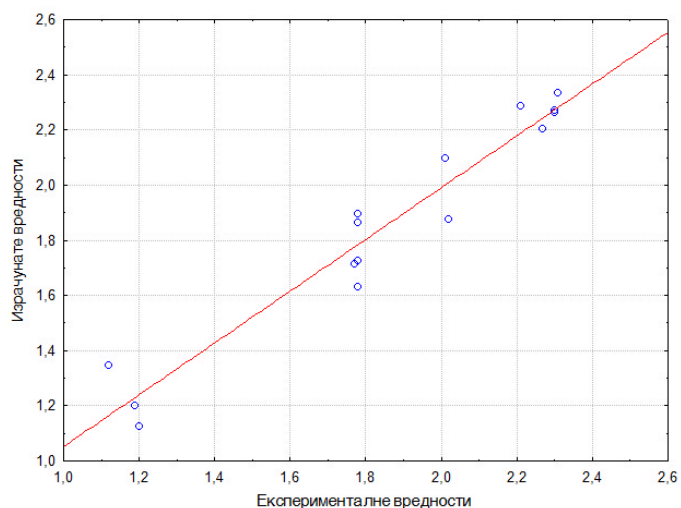
Слика П. 3. Ток ферментације хранљивих подлога на бази густог сока
применом различитих типова квасца

ЈП-суви квасац за производњу јаких алкохолних пића, В-суви вински квасац, ВТ-суви вински квасац толерантан на повишен садржај етанола, РС-свежи пекарски квасац и ПСВ-суви пекарски квасац

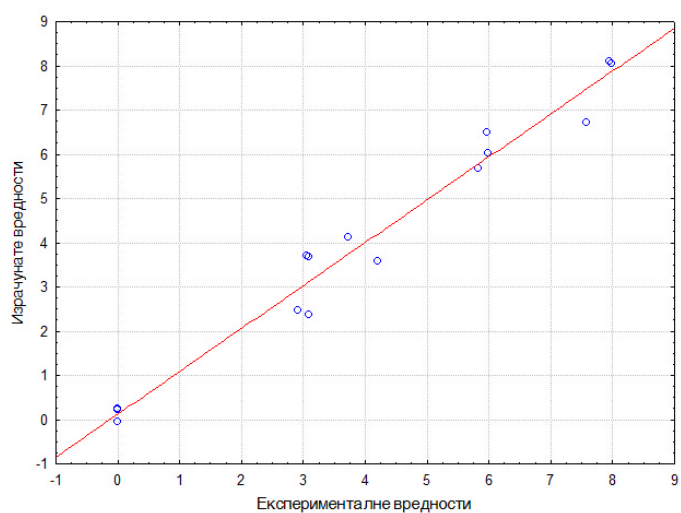


Слика П. 4. Ток ферментације хранљивих подлога на бази меласе
применом различитих типова квасца

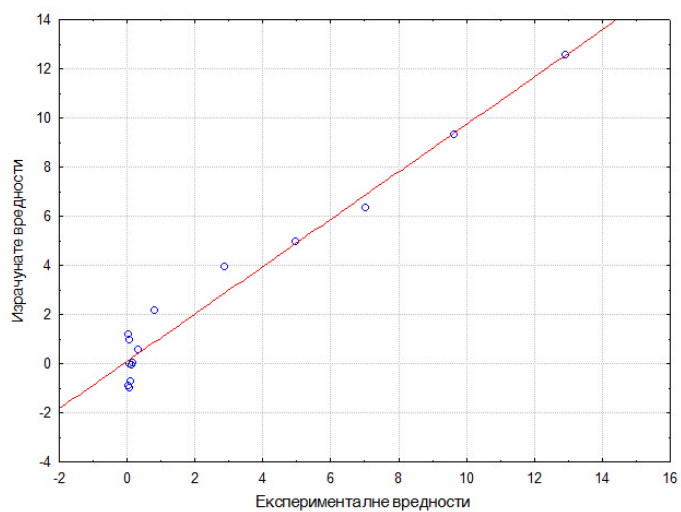
ЈП-суви квасац за производњу јаких алкохолних пића, В-суви вински квасац, ВТ-суви вински квасац толерантан на повишен садржај етанола, ПС-свежи пекарски квасац и ПСВ-суви пекарски квасац



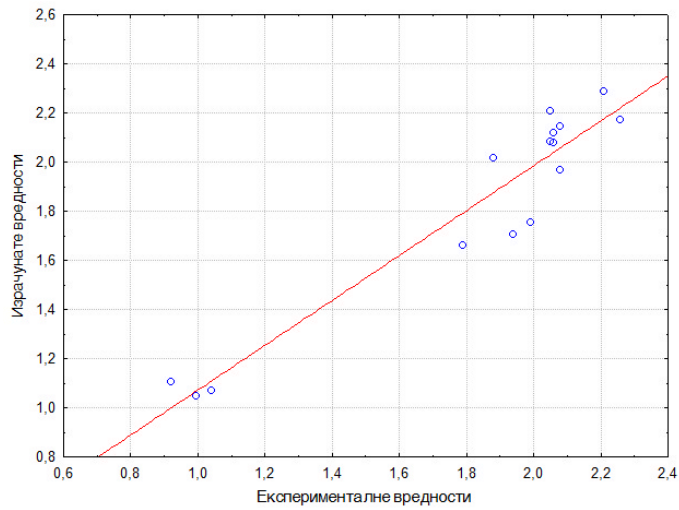
Слика П.5. Поређење експериментално добијених вредности броја ћелија квасца током ферментације екстракционог сока и вредности предвиђених моделом



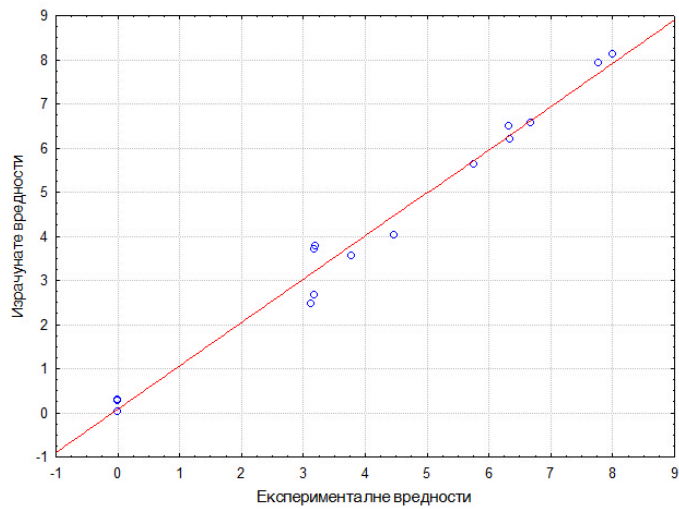
Слика П.6. Поређење експериментално добијених вредности садржаја етанола током ферментације екстракционог сока и вредности предвиђених моделом



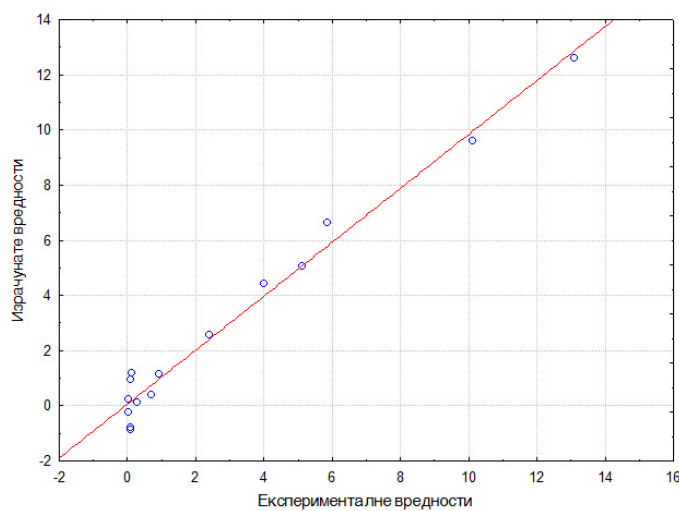
Слика П.7. Поређење експериментално добијених вредности укупног садржаја шећера током ферментације екстракционог сока и вредности предвиђених моделом



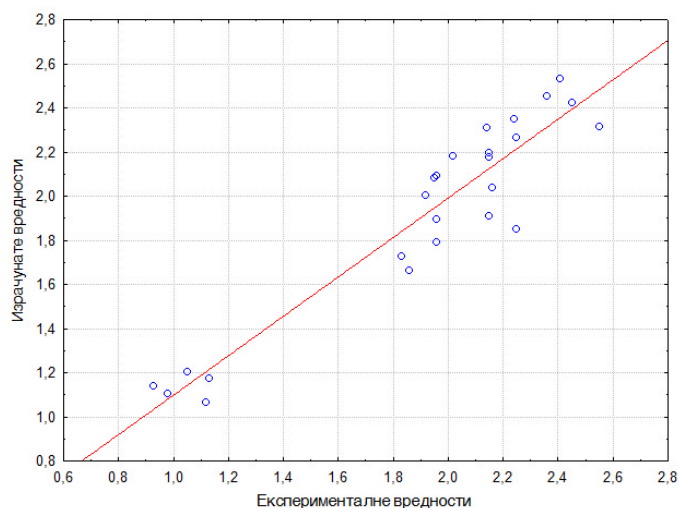
Слика П.8. Поређење експериментално добијених вредности броја ћелија квасца током ферментације ретког сока и вредности предвиђених моделом



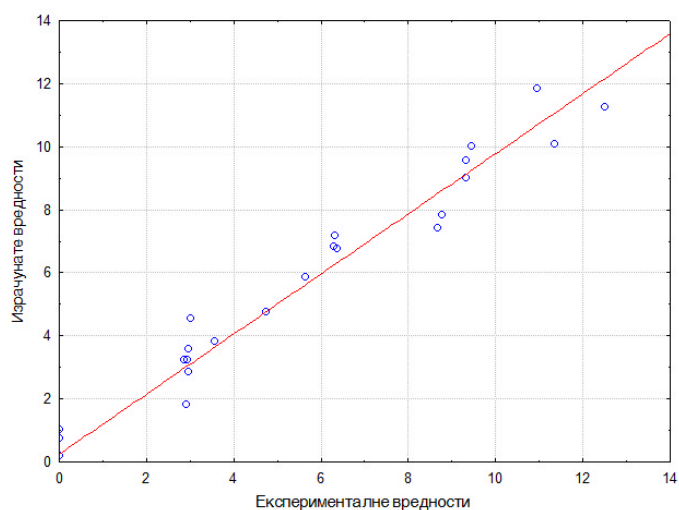
Слика П.9.Поређење експериментално добијених вредности садржаја етанола током ферментације ретког сока и вредности предвиђених моделом



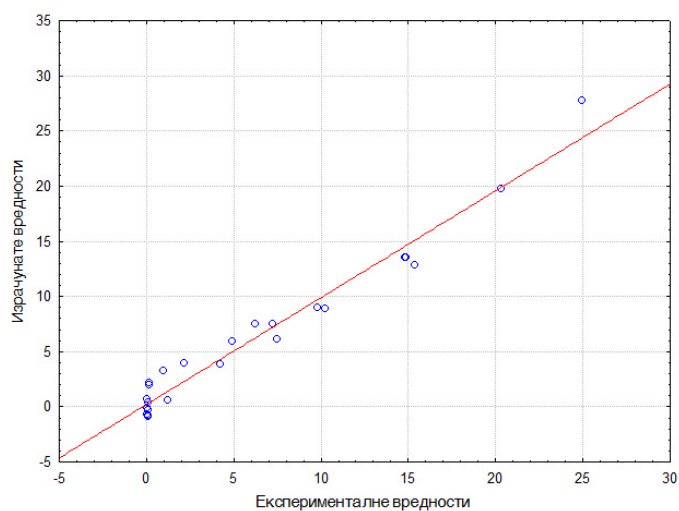
Слика П.10. Поређење експериментално добијених вредности укупног садржаја шећера током ферментације ретког сока и вредности предвиђених моделом



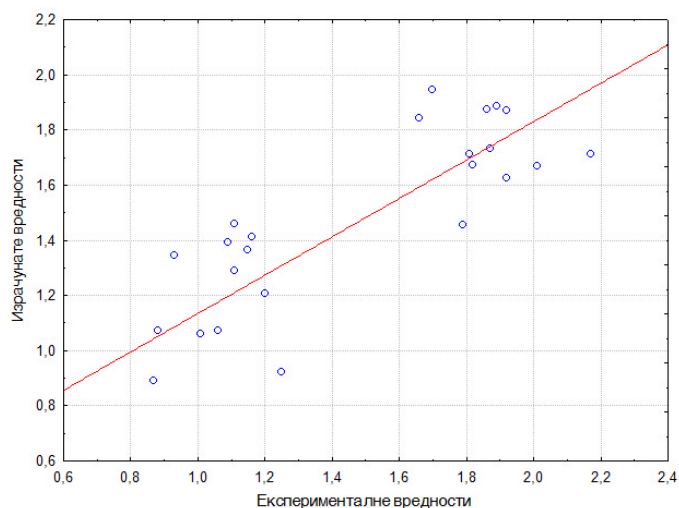
Слика П.11. Поређење експериментално добијених вредности броја ћелија квасца током ферментације густог сока и вредности предвиђених моделом



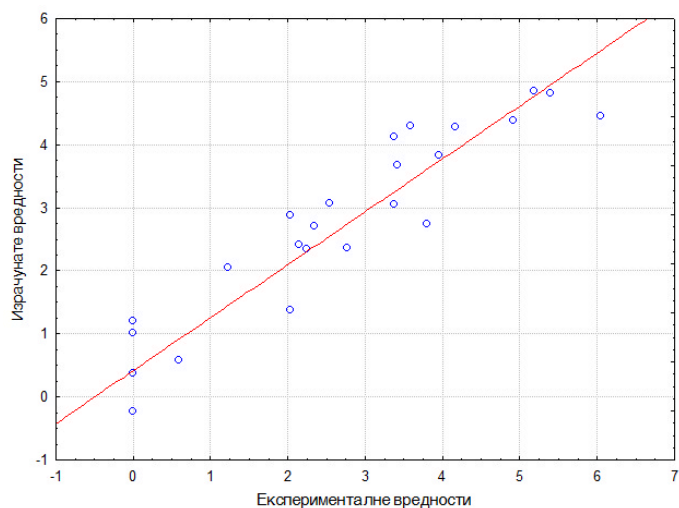
Слика П.12. Поређење експериментално добијених вредности садржаја етанола током ферментације густог сока и вредности предвиђених моделом



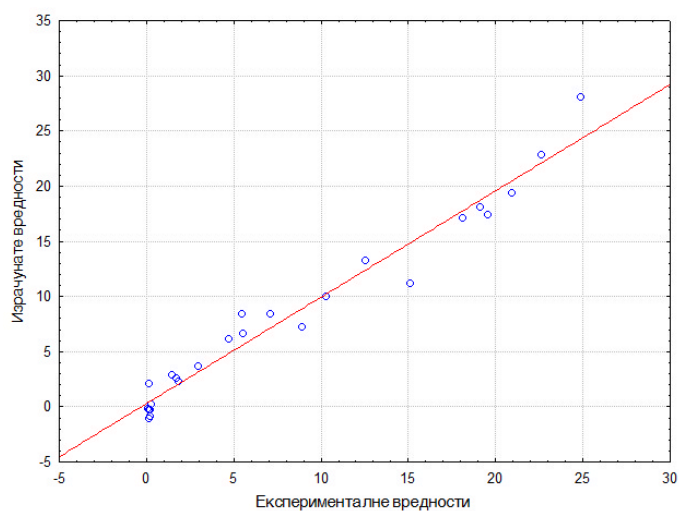
Слика П.13. Поређење експериментално добијених вредности укупног садржаја шећера током ферментације густог сока и вредности предвиђених моделом



Слика П.14. Поређење експериментално добијених вредности броја ћелија квасца током ферментације меласе и вредности предвиђених моделом



Слика П.15. Поређење експериментално добијених вредности садржаја етанола током ферментације меласе и вредности предвиђених моделом



Слика П.16. Поређење експериментално добијених вредности укупног садржаја шећера током ферментације меласе и вредности предвиђених моделом

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА
ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	монографска документација
Тип записа: ТЗ	текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	докторска дисертација
Аутор: АУ	Јована А. Граховац
Ментор: МН	др Јелена Додић, доцент Технолошког факултета у Новом Саду
Наслов рада НР	"Оптимизација добијања етанола ферментацијом међупроизвода технологије прераде шећерне репе"
Језик публикације: ЈП	српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	српски/енглески
Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Војводина
Година: ГО	2011.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Булевар цара Лазара 1
Физички опис рада: ФО	број поглавља 8, стр. 111, литературних навода 92, табела 28, слика 64, једначина 19
Научна област: НО	Технолошко инжењерство
Научна дисциплина: НД	Биотехнологија

Предметна одредница/кључне речи: ферментација, етанол, оптимизација,
ПО међупроизводи шећеране

УДК: 661.722:663.142:664.127

Чува се: Библиотека Технолошког факултета у Новом Саду,
ЧУ 21000 Нови Сад, Булевар цара Лазара 1, Србија

Важна напомена: нема
ВН

Извод/абстракт:
ИЗ

Датум прихватања теме од стране НН Већа Факултета: 28. и 31.05.2010. године
ДП

Датум одбране:
ДО

Чланови комисије:
КО

Председник: др Влада Вељковић, ред. проф. Технолошког факултета у Лесковцу
Члан: др Јелена Додић, доцент Технолошког факултета у Новом Саду
Члан: др Стеван Попов, ред. проф. Технолошког факултета у Новом Саду

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: monographic publication
DT

Type of record: textual material, printed
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Jovana A. Ranković
AU

Menthor: Jelena Dodić, ass. prof., Faculty of Technology, Novi Sad
MN

Title: "Optimization of ethanol production from intermediate products of
sugar beet technology"
TI

Language of text: Serbian (cyrilic)
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2011.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publishing place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: Chapters 8, pages 111, references 92,
tables 28, pictures 64, equations 19
PD

Scientific field: Technological engineering
SF

Scientific discipline: Biotechnology
SD

Subject/key words: fermentation, ethanol, optimization, intermediate products of
SX sugar beet technology

UDK: 661.722:663.142:664.127

Holding data: Library of Faculty of Technology,
HD 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia

Note: none
N

Abstract:
AB

Accepted by the Scientific Board on: 28th and 31st May 2010
ASB

Defended on:
DE

Thesis defend board:
DB

President: dr Vlada Veljković, Professor, Faculty of Technology, Leskovac
Member dr Jelena Dodić, Assist. Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Stevan Popov, Professor, Faculty of Technology, Novi Sad