

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**  
**Katedra za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju**

**Svetlana B. Nikolić**

**Proizvodnja bioetanola kao alternativnog goriva iz  
kukuruza pomoću slobodnog i imobilisanog kvasca  
*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus***

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2009.**

MENTOR:

---

Dr Ljiljana Mojović,  
redovni profesor TMF-a

ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Marica Rakin,  
docent TMF-a

---

Dr Maja Vukašinović-Sekulić,  
docent TMF-a

---

Dr Dušanka Pejin,  
redovni profesor u penziji  
TF-a u Novom Sadu

KANDIDAT:

---

Svetlana Nikolić, dipl.inž.teh.

DATUM PRIJAVE: \_\_\_\_\_

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

*Posebnu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Ljiljani Mojović na svestranoj pomoći, sugestijama, konsultacijama i savesnom praćenju realizacije ove doktorske disertacije, kao i na stručnim savetima, velikoj pomoći i podršci koje mi je pružila u toku mog celokupnog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada.*

*Prof. dr Marici Rakin, prof. dr Maji Vukašinović-Sekulić i prof. dr Dušanki Pejin neizmerno zahvaljujem na stručnim savetima, velikoj pomoći u eksperimentalnom radu, podršci i korisnim sugestijama i korekcijama koji su pomogli uspešnoj izradi ove teze.*

*Takođe zahvaljujem se i kolegama sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na savetima i ukazanoj pomoći u toku izrade ove teze.*

*Posebnu i neizmernu zahvalnost za razumevanje i moralnu podršku dugujem svojoj porodici i prijateljima.*

## IZVOD

Jedan od najznačajnijih alternativnih izvora energije je bioetanol kao obnovljivo i ekološki pogodno biogorivo. Trend proizvodnje ovog goriva u svetu je rastući, međutim u Srbiji danas ne postoji organizovana proizvodnja i potrošnja bioetanola kao motornog goriva, čime se ukazuje na veliki značaj ispitivanja i optimizacije postupka njegove proizvodnje. Cilj ove disertacije je razvijanje postupka dobijanja bioetanola iz kukuruza pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Kao sirovine korišćeni su kukuruzno brašno i kukuruzna krupica, s obzirom da se žitarice smatraju najperspektivnijim sirovinama za proizvodnju etanola u Srbiji.

Prvobitno je ispitivan proces dvojno-enzimske hidrolize koja je izvođena pomoću enzima termostabilne  $\alpha$ -amilaze Temamyl SC i glukoamilaze SAN Extra L. Izabrano je kukuruzno brašno kao sirovina. Optimizacijom obe faze hidrolize (likvefakcije i saharifikacije) kukuruznog brašna sa aspekta kranjeg prinosa glukoze i mogućnosti daljeg izvođenja faze alkoholne fermentacije, usvojeni su sledeći optimalni parametri procesa: hidromodul (odnos kukuruznog brašna i vode) 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w).

Ispitivanjem fermentativnih sposobnosti četiri različite vrste kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* i *Schizosaccharomyces pombe*) na hidrolizatu kukuruznog brašna, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* je pokazao najbolje fermentativne karakteristike, pa je korišćen kao proizvodni mikroorganizam. Ispitivana je alkoholna fermentacija hidrolizata kukuruznog brašna pomoću slobodnog i imobilisanog kvasca, i to u:

- procesu odvojene saharifikacije i fermentacije (SHF) sa i bez dodatka aktivatora kvasca (vitamina i minerala),
- procesu simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) sa i bez dodatka aktivatora kvasca, kao i sa i bez recirkulacije imobilisanog kvasca. U sistemu sa slobodnim ćelijama kvasca ispitivana je i primena predtretmana mikrotalasima i ultrazvukom.

Tokom ispitivanja ovih procesa praćen je uticaj reakcionih uslova na promenu sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija kvasca, kao i ostalih procesnih parametara: prinosa etanola, procenta od teorijskog sadržaja etanola, volumetrijske

produktivnosti i potrošnje glukoze. Optimizacijom svakog od ovih procesa usvojeni su sledeći optimalni parametri: početna koncentracija glukoze, količina inokuluma i vreme trajanja fermentacije, kao i temperatura izvođenja SSF procesa i najpogodniji aktivatori kvasca i njihova koncentracija.

Utvrđeno je da je u proizvodnji etanola iz kukuruznog brašna pomoću slobodnih ćelija kvasca ekonomski najpovoljniji i najefikasniji SSF proces bez dodatka aktivatora. Takođe, u sistemu sa slobodnim ćelijama, primenom predtretmana ultrazvukom (60 °C, 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC) i mikrotalasima (80 W, 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC) ostvaren je porast sadržaja etanola 9,31% i 13,45%, respektivno, u odnosu na kontrolni uzorak, nakon 32 h SSF procesa. Pri optimalnim parametrima usvojenim za fermentaciju sa slobodnim i imobilisanim kvascem, ustanovljeno je da su više vrednosti sadržaja etanola i drugih procesnih parametara postignute u imobilisanom sistemu. Imobilisane ćelije pokazale veću tolerantnost prema višim koncentracijama supstrata i proizvoda u odnosu na slobodne ćelije kvasca. U toku fermentacije sa recirkulacijom imobilisanog kvasca, ćelije imobilisane u Ca-alginatu su očuvale svoju aktivnost odnosno fizičku i hemijsku stabilnost u proizvodnji etanola tokom 3 dana, i nisu zapažena ograničenja difuzije supstrata i proizvoda.

Sa aspekta smanjenja ukupnih troškova proizvodnje i uštede energije, kao optimalni postupak proizvodnje bioetanola iz kukuruznog brašna izabran je SSF proces pomoću imobilisanih ćelija kvasca i sa dodatkom mineralnih soli ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,3 g/l i  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g/l) kao aktivatora kvasca, kada su postignuti sledeći procesni parametri: sadržaj etanola od 10,23% (w/w), prinos etanola od 0,53 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 94,11%, volumetrijska produktivnost od 2,13 g/l·h i potrošnja glukoze od 98,92% nakon 48 h procesa.

**Ključne reči:** bioetanol, alternativno gorivo, kukuruz, dvojno-enzimska hidroliza, amilaza, glukoamilaza, alkoholna fermentacija, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, simultana saharifikacija i fermentacija (SSF), aktivatori kvasca, mikrotalasi, ultrazvuk, imobilizacija, recirkulacija, Ca-alginat.

## ABSTRACT

One of the most important alternative energy resources is bioethanol which is a renewable and ecologically favorable biofuel. The trend of bioethanol production in the world is increasable, but in Serbia there is no organized production and consumption of bioethanol as a motor fuel, hereby emphasizing the great importance of investigation and optimization of its production process. The aim of this thesis was to investigate the bioethanol production from corn by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* yeast. Taking into consideration that cereals are the most promising feedstocks in Serbia, the corn meal and corn semolina have been used as feedstocks in this work.

The two-step hydrolysis with thermostable  $\alpha$ -amylase Termamyl SC and glucoamylase SAN Extra L was initially investigated. The corn meal was chosen as an optimal feedstock. By optimization of both hydrolysis phases (liquefaction and saccharification) of corn meal from the point of final glucose yield and suitability for further ethanol fermentation, the following parameters were selected as optimal: hidromodul (weight ratio of corn meal and water) 1:3, the concentration of enzyme Termamyl SC of 0.02% (v/w) and concentration of enzyme SAN Extra L of 0.12% (v/w).

In this thesis the yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* was used since it was found to be the most superior among four tested yeasts: *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* and *Schizosaccharomyces pombe* concerning its fermentative characteristics. The ethanol fermentation of corn meal hydrolyzates by free and immobilized yeast cells was investigated in the following processes:

- separated hydrolysis and fermentation (SHF) with and without yeast activators,
- simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with and without yeast activators, as well as with and without immobilized yeast recirculation. In the free cells system the application of microwaves and ultrasound as a pretreatments was investigated.

In all these processes the effect of process conditions on ethanol and glucose concentration, and on the number of yeast cells, as well as on other parameters such as: ethanol yield, percentage of theoretical ethanol yield, volumetric productivity and glucose

consumption was investigated and analyzed. The initial glucose and inoculum concentration and the time required for the efficient ethanol production were optimized for each process mentioned above, as well as temperature and the type and concentration of the most appropriate yeast activators.

Economically most favorable and most efficient process for bioethanol production in free cell system was SSF process without yeast activators. Also, an increase of ethanol concentration of 9.31% and 13.45% over untreated control sample was achieved after 32 h of SSF process using ultrasound (60 °C, 2.5 min before and 2.5 min after addition of enzyme Termamyl SC) and microwave (80 W, 2.5 min before and 2.5 min after addition of enzyme Termamyl SC) pretreatments, respectively. Under the optimal conditions, it was shown that higher values of ethanol concentration and other process parameters were achieved in immobilized system, compared to cell free system. Also, it was demonstrated that immobilized cells exhibited an elevated tolerance to higher substrate and product concentrations compared to the free cells. During ethanol production with yeast recirculation, the yeast cells entrapped in Ca-alginate showed good physical and chemical stability after 3 days, and no substrate and product diffusion restrictions were noticed.

In order to decrease total production costs and save energy, the SSF process of corn meal by immobilized yeast and with yeast activators ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g/l and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/l) was chosen to be an optimal process mode for bioethanol production. In this case the ethanol concentration of 10.23% w/w, the ethanol yield of 0.53 g/g, percentage of the theoretical ethanol yield of 94.1%, the volumetric productivity of 2.13 g/l·h and glucose consumption of 98.92% were achieved after 48 h of the process.

**Key words:** bioethanol, alternative fuel, corn, two-step hydrolysis, amylase, glucoamylase, alcoholic fermentation, yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), yeast activators, microwaves, ultrasound, immobilization, recirculation, Ca-alginate.

## SADRŽAJ

<b>I TEORIJSKI DEO.....</b>	<b>1</b>
<b>UVOD.....</b>	<b>2</b>
<b>1. ZNAČAJ BIOETANOLA KAO ALTERNATIVNOG GORIVA.....</b>	<b>5</b>
1.1. Proizvodnja i potrošnja energije u svetu.....	5
1.2. Proizvodnja bioetanola kao goriva u svetu i kod nas - stanje i perspektive.....	10
1.2.1. Severna i Latinska Amerika.....	14
1.2.2. Evropska Unija.....	17
1.2.3. Azija.....	21
1.2.4. Australija.....	22
1.2.5. Srbija.....	22
1.3. Osnovne karakteristike bioetanola kao goriva.....	26
1.4. Ekološki značaj primene bioetanola.....	29
1.4.1. Emisija štetnih gasova pri sagorevanju motornih goriva i bioetanola.....	30
1.4.2. Održivi razvoj u funkciji zaštite životne sredine.....	35
<b>2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA.....</b>	<b>36</b>
2.1. Šećerne sirovine.....	38
2.2. Lignocelulozne sirovine.....	39
2.3. Nus proizvodi raznih tehnologija.....	41
2.4. Skrobne sirovine.....	42
2.4.1. Kukuruz kao sirovina za proizvodnju bioetanola.....	45
2.4.2. Skrob.....	48
<b>3. TEHNOLOGIJA PROZVODNJE BIOETANOLA.....</b>	<b>51</b>
3.1. Osnovne faze proizvodnje bioetanola.....	51
3.2. Priprema skrobnih sirovina za alkoholnu fermentaciju.....	52
3.2.1. Hidroliza kukuruznog skroba.....	52
3.2.1.1. Dvojno-enzimski postupak hidrolize skroba.....	55
3.2.1.2. Enzimi koji katalizuju hidrolizu skroba.....	57
3.2.2. Primena ultrazvuka i mikrotalasa kao predtretmana za dobijanje hidrolizata kukuruza.....	60



3.2.2.1. Predtretman ultrazvukom.....	60
3.2.2.2. Predtretman mikrotalasima.....	64
3.3. Alkoholna fermentacija.....	66
3.3.1. Faktori koji utiču na tok i efikasnost alkoholne fermentacije.....	67
3.3.2. Karakteristike proizvodnih mikroorganizama.....	73
3.3.2.1. Kvasci.....	73
3.3.2.1.1. Istorija, rasprostranjenost i morfološke karakteristike kvasaca.....	73
3.3.2.1.2. Klasifikacija kvasaca.....	75
3.3.2.1.3. Metabolizam kvasaca.....	80
3.3.2.1.4. Rast i razmnožavanje kod kvasaca.....	84
3.3.2.1.5. Kvasci kao producenti bioetanola.....	87
3.3.2.2. Bakterije.....	90
3.3.3. Alkoholna fermentacija sa imobilisanim mikroorganizmima.....	92
3.3.4. Metode izvođenja fermentacije u proizvodnji bioetanola.....	95
3.4. Izdvajanje proizvoda.....	98
3.5. Sporedni proizvodi u proizvodnji bioetanola.....	103
3.6. Tehno-ekonomski aspekti proizvodnje bioetanola.....	105
<b>II EKSPERIMENTALNI DEO.....</b>	<b>108</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE RADA.....</b>	<b>109</b>
4.1. Materijali.....	109
4.2. Metode .....	111
4.2.1. Izvođenje dvojno-enzimske hidrolize.....	111
4.2.2. Predtretman suspenzije kukuruznog brašna ultrazvukom.....	113
4.2.3. Predtretman suspenzije kukuruznog brašna mikrotalasima.....	113
4.2.4. Priprema laboratorijske kulture.....	114
4.2.5. Testovi karakterizacije kvasca <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> .....	115
4.2.6. Izvođenje alkoholne fermentacije.....	116
4.2.7. Izvođenje postupka simultane saharifikacije i fermentacije (SSF).....	118
4.2.8. Postupak imobilizacije ćelija kvasca <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> u Ca- alginatu.....	118
4.2.9. Određivanje sadržaja redukujućih šećera u hidrolizatu.....	120

4.2.10. Određivanje sadržaja etanola.....	122
4.2.11. Određivanje ukupnog broja ćelija kvasca.....	124
4.2.11.1. Kohova metoda agarne ploče.....	124
4.2.11.2. Direktno brojanje pomoću komora za brojanje po Rosenthal-u.....	124
4.2.12. Polarimetrijska metoda za određivanje sadržaja kukuruznog skroba....	125
4.2.13. Metoda za određivanje sadržaja suve materije.....	127
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>129</b>
<b>5.1. Dvojno-enzimska hidroliza skroba kukuruznog brašna.....</b>	<b>129</b>
5.1.1. Hemijski sastav kukuruzne krupice i kukuruznog brašna.....	129
5.1.2. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice pri različitim hidromodulima.....	130
5.1.3. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruznog brašna pri različitim hidromodulima.....	132
5.1.4. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri konstantnoj koncentraciji enzima Termamyl SC i različitim hidromodulima.....	134
5.1.5. Određivanje optimalne koncentracije enzima Termamyl SC u fazi likvefakcije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3.....	138
5.1.6. Određivanje optimalne koncentracije enzima SAN Extra L u fazi saharifikacije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3.....	143
5.1.7. Kinetika dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna.....	145
<b>5.2. Alkoholna fermentacija hidrolizata kukuruznog brašna.....</b>	<b>147</b>
5.2.1. Ispitivanje fermentativne sposobnosti različitih sojeva kvasaca na hidrolizatu kukuruznog brašna.....	147
5.2.2. Karakterizacija proizvodnog mikroorganizma <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> .....	149
5.2.3. Alkoholna fermentacija sa slobodnim ćel. kvasca <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> .....	150

5.2.3.1. Uticaj početne koncentracije glukoze na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri konstantnoj količini inokuluma....	150
5.2.3.2. Uticaj količine inokuluma na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri optimalnoj početnoj koncentraciji glukoze.....	154
5.2.3.3. Uticaj dodatka različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina) na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri optimalnim vrednostima početne koncentracije glukoze i količine inokuluma.....	157
5.2.3.4. Proizvodnja etanola u postupku simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kukuruznog brašna.....	164
5.2.3.4.1. Uticaj temperature na tok SSF procesa.....	164
5.2.3.4.1. Uticaj dodatka različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina) na tok SSF procesa.....	170
5.2.3.5. Poređenje SHF (odvojena saharifikacija i fermentacija) i SSF (simultana saharifikacija i fermentacija) procesa kukuruznog brašna, sa i bez dodatka aktivatora kvasca.....	177
5.2.3.6. Uticaj ultrazvuka kao predtretmana na poboljšanje kvaliteta hidrolizata kukuruznog brašna i proizvodnju etanola tokom SSF procesa .....	179
5.2.3.6.1. Uticaj vremena dejstva ultrazvuka na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna.....	179
5.2.3.6.2. Uticaj dejstva ultrazvuka na kinetiku enzimske hidrolize kukuruznog brašna pri optimalnom vremenu i različitoj temperaturi soniciranja.....	183
5.2.3.6.3. Uticaj dejstva ultrazvuka kao predtretmana na kinetiku SSF procesa pri optimalnom vremenu i temperaturi dejstva ultrazvuka.....	186
5.2.3.7. Uticaj mikrotalasa kao predtretmana na poboljšanje kvaliteta hidrolizata kukuruznog brašna i proizvodnju etanola tokom SSF procesa.....	190
5.2.3.7.1. Uticaj snage mikrotalasa na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna.....	190

5.2.3.7.2. Uticaj vremena dejstva mikrotalasa na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna.....	192
5.2.3.7.3. Uticaj dejstva mikrotalasa kao predtretmana na kinetiku SSF procesa pri optimalnom vremenu i snazi dejstva mikrotalasa.....	198
5.2.4. Alkoholna fermentacija sa imobilisanim ćelijama kvasca <i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoideus</i> .....	202
5.2.4.1. Uticaj početne koncentracije glukoze na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri konstantnoj količini inokuluma imobilisanog kvasca.....	202
5.2.4.2. Uticaj količine inokuluma imobilisanog kvasca na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri optimalnoj početnoj koncentraciji glukoze.....	206
5.2.4.3. Poređenje proizvodnje bioetanolu pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca tokom SHF procesa (odvojene saharifikacije i fermentacije).....	208
5.2.4.4. Kinetika alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa recirkulacijom imobilisanih ćelija kvasca.....	210
5.2.4.5. Proizvodnja etanola u postupku simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kukuruznog brašna pomoću imobilisanog kvasca.....	213
5.2.4.5.1. Uticaj temperature na tok SSF procesa.....	213
5.2.4.5.2. Uticaj dodatka različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina) na tok SSF procesa.....	218
5.2.4.6. Poređenje proizvodnje bioetanolu pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca tokom SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez dodatka aktivatora.....	223
<b>ZAKLJUČAK</b> .....	227
<b>LITERATURA</b> .....	232
<b>PRILOG</b> .....	251

***TEORIJSKI DEO***

## UVOD

Svetsko društvo je danas suočeno sa kompleksnim ekonomskim i ekološkim pitanjima koja se odnose na potrošnju i primenu energije. Usled rasta populacije i značajnog industrijskog i privrednog razvoja dolazi do neprekidnog porasta potrošnje energije u njenim različitim oblicima, uprkos znatnom povećanju cene energije poslednjih godina i značajnim negativnim uticajima na životnu sredinu. U XX veku svetska potrošnja energije je povećana čak 17 puta. Zbog ograničenosti i iscrpljenosti konvencionalnih izvora energije, kao što su fosilna goriva, neophodno je preduzeti krupne korake u sprovođenju planova održivog razvoja koji obezbeđuju racionalno korišćenje postojećih energetske resursa, kao i pronalaženje novih, obnovljivih (alternativnih) izvora energije. Jedan od značajnih alternativnih izvora energije je bioetanol koji predstavlja obnovljivo i ekološki pogodno biogorivo, odnosno biodegradibilan izvor energije koji obezbeđuje održivi razvoj [1, 2].

Svetska proizvodnja etanola u 2007. god. iznosila je oko 50 milijardi litara, a od 2000. godine dolazi do postepenog porasta ukupne proizvodnje (prema dugoročnoj proceni svetska proizvodnja bioetanola bi bila oko 80 milijardi litara u 2010. godini) [3]. Razlozi za svetski trend povećanja korišćenja bioetanola kao goriva su: velika raspoloživost biomase kao sirovine za proizvodnju etanola, manji negativni efekti na životnu sredinu od efekata koje imaju fosilna goriva (smanjenje emisije CO<sub>2</sub>), pozitivan neto energetske bilans (energija koja je sadržana u toni etanola veća je od energije potrebne da se ona proizvede), smanjenje zavisnosti od uvoza nafte i njenih derivata u zemljama koje ne proizvode naftu, povećanje stope zaposlenosti, razvijanje ruralnih zajednica itd. Bioetanol se može proizvesti hemijskom sintezom ili fermentacijom. Od ukupne proizvodnje etanola u svetu preko 60% se proizvodi putem fermentacije [2, 4, 5]. Ovo biogorivo se može koristiti kao čist etanol (u posebno konstruisanim motorima) ili kao dodatak motornom benzinu [6].

Bioetanol se može dobiti iz različitih sirovina: šećernih, skrobnih, lignoceluloznih sirovina i nus proizvoda raznih tehnologija. Da bi proizvodnja etanola biotehnoškim putem bila ekonomična, potrebno je koristiti sirovinu koja je dovoljno jeftina i daje zadovoljavajući prinos etanola u što jednostavnijem procesu. Žitarice, a posebno

kukuruz, se smatraju najperspektivnijim sirovinama za proizvodnju etanola u Srbiji. U postupku proizvodnje bioetanola, skrobne sirovine se prethodno enzimski tretiraju u dve uzastopne faze hidrolize (likvefakcija i saharifikacija) pomoću amilolitičkih enzima:  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze. Nakon ove faze vrši se fermentacija šećera, koja se u klasičnim postupcima izvodi pomoću kvasaca (najčešće iz roda *Saccharomyces*), a mogu se koristiti i određene bakterije. Alkoholna fermentacija može se izvoditi pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija. Poslednjih godina, veliku pažnju upravo je privukla imobilizacija ćelija kvasca s obzirom na prednosti koje ima u odnosu na slobodne ćelijske sisteme, a to su stabilnost kvasca, povećanje prinosa etanola i produktivnosti, mogućnost eliminacije inhibicije proizvodom i substratom itd. [7].

U Evropskoj Uniji proizvodnja bioetanola se posebno podstiče donošenjem direktive o korišćenju biogoriva (Direktiva 2003/30/EC) kojom se obavezuju zemlje članice da proizvedu ili obezbede na tržištu minimalne količine biogoriva kojim bi se zadovoljili ciljevi da se do kraja 2005. godine obezbedi zamena od 2% fosilnih goriva, a do kraja 2010. od 5,75% mereno u odnosu na sadržaj energije. Ova direktiva je u skladu sa Kjoto sporazumom potpisanim 1997. godine sa ciljem da se smanji emisija gasova koji doprinose efektu staklene bašte [8]. U Srbiji danas ne postoji organizovana proizvodnja i potrošnja bioetanola kao motornog goriva (iako je Srbija uvoznik značajnog dela svoje potrošnje motornih goriva), i pored toga što poseduje neophodan preduslov, a to je raspoloživost obnovljivim sirovinama tj. biomasom. Za proizvodnju energije koristi se svega oko 1,5% ukupne godišnje proizvodnje biomase, ali postoje određeni trendovi i državne aktivnosti koje podržavaju i promovišu efikasnije korišćenje energije biomase [9]. U Srbiji postoji težnja ka priključenju globalnom projektu podsticanja proizvodnje bioetanola. Međutim, zbog velikih troškova samog procesa neophodno je intenzivno raditi na optimizaciji i usavršavanju postupaka proizvodnje na čemu je i baziran najveći broj naučno-istraživačkih inicijativa.

Cilj ove disertacije je razvijanje postupka dobijanja bioetanola kao alternativnog goriva iz kukuruza pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. U prvom delu eksperimentalnog rada vršena je optimizacija procesa dvojno-enzimske hidrolize koja je izvođena pomoću enzima termostabilne  $\alpha$ -amilaze Temamyl SC i glukoamilaze SAN Extra L. Kao sirovine korišćeni su kukuruzno brašno i kukuruzna krupica. Početna koncentracija supstrata i početna koncentracija

enzima su optimizovani za obe faze enzimske hidrolize sa aspekta krajnjeg prinosa glukoze i mogućnosti daljeg izvođenja faze alkoholne fermentacije, u cilju dobijanja što većeg prinosa etanola kao krajnjeg proizvoda. Ispitana je primena predtretmana sirovine, dejstvom ultrazvučnih talasa i mikrotalasa, koji pospešuju razaranje skrobnih zrnaca a samim tim obezbeđuju i efikasnije izvođenje enzimske hidrolize. Pri utvrđenim optimalnim parametrima definisana je kinetika reakcije dvojno-enzimske hidrolize.

U drugom delu eksperimentalnog rada vršena je optimizacija procesa alkoholne fermentacije dobijenih kukuruznih hidrolizata. Ispitane su fermentativne karakteristike kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, s obzirom da se u klasičnim postupcima dobijanja etanola koristi kvasac gornjeg vrenja *Saccharomyces cerevisiae*. Reakcioni uslovi, kao što su početna koncentracija glukoze, početna koncentracija inokuluma i vreme trajanja fermentacije su optimizovani u cilju dobijanja što većeg prinosa etanola. Praćen je uticaj reakcionih uslova na promenu sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija kvasca. Korišćene su slobodne i imobilisane ćelije kvasca i izvršeno je poređenje osnovnih procesnih parametara kako bi se odredilo koji je sistem superorniji. Kod imobilisanog sistema ispitana je mogućnost recirkulacije kvasca. Radi povećanja sadržaja etanola i produktivnosti samog procesa ispitano je i obogaćivanje hidrolizata, kao fermentacionog medijuma, dodatkom određenih aktivatora kvasca (vitamina i mineralnih soli), i u slobodnom i imobilisanom sistemu. U cilju dobijanja većeg prinosa etanola, kao i poboljšanja ekonomike procesa sa aspekta potrošnje energije i ukupne dužine trajanja procesa, ispitan je proces simultane saharifikacije i fermentacije (SSF proces). Pri određenim optimalnim parametrima definisana je kinetika procesa alkoholne fermentacije.



# **1. ZNAČAJ BIOETANOLA KAO GORIVA**

## **1.1. PROIZVODNJA I POTROŠNJA ENERGIJE**

Energija u užem smislu podrazumeva sposobnost sistema (mašine) da izvrši rad ili proizvede drugi oblik energije. U najopštijem smislu, energija je jedan od oblika postojanja (egzistencije) materije. Tehno-fizički gledano energija se javlja u različitim oblicima, kao što su mehanička, toplotna, električna, svetlosna, hemijska i nuklearna energija [10]. Energija predstavlja jedan od najvažnijih činilaca razvoja i funkcionisanja privrede i društva, osnovni pokretač i deo svih ljudskih aktivnosti. Raspoloživost energetske izvora, korišćenje postojećih i pronalaženje novih izvora energije, racionalna transformacija u finalne oblike potrošnje, stabilnost i sigurnost upotrebe presudno utiču na dinamiku razvoja i rasta privrede, društva i sveta u celini. Samim tim, kako bi se omogućio predviđen privredni razvoj razvojna energetska politika svake zemlje treba da se usmeri ka obezbeđivanju sigurnih i dovoljnih količina energije, uz što niže troškove i primenu mera i aktivnosti racionalnog korišćenja energije. Kroz istoriju, a i u sadašnjosti, zbog borbe oko pojedinih energetske izvora dolazi do brojnih sukoba i ratova, a energetske krize su dovodile do poremećaja i kriza na globalnom nivou. O značaju energije govori i činjenica da su se industrijske revolucije pre svega razlikovale po otkrićima i primeni novih izvora energije. Prva industrijska revolucija po otkriću i primeni vodene pare, druga po otkriću i primeni nafte i električne energije, i treća pored otkrića i primene nuklearne energije i po usavršavanju postojećih izvora energije [11].

Energija se može podeliti na primarnu i sekundarnu (korisnu) energiju. Primarna energija se javlja u vidu obnovljivih (biomasa, energija vetra, solarna energija, hidroenergija i geotermalna energija) i neobnovljivih (ugalj, prirodni gas, nafta i njeni derivati i nuklearna energija) izvora energije. Sekundarna energija dobija se konverzijom ili transformacijom iz primarne energije ili drugih formi u električnu energiju, hidro i rafinacijske naftne proizvode [12].

U tabeli 1.1. prikazana je struktura proizvodnje primarne energije u svetu u periodu od 1960-2005. god., kao i projekcija te strukture u 2020. godini [12, 13].

Tabela 1.1. Struktura proizvodnje primarne energije u svetu [12, 13]

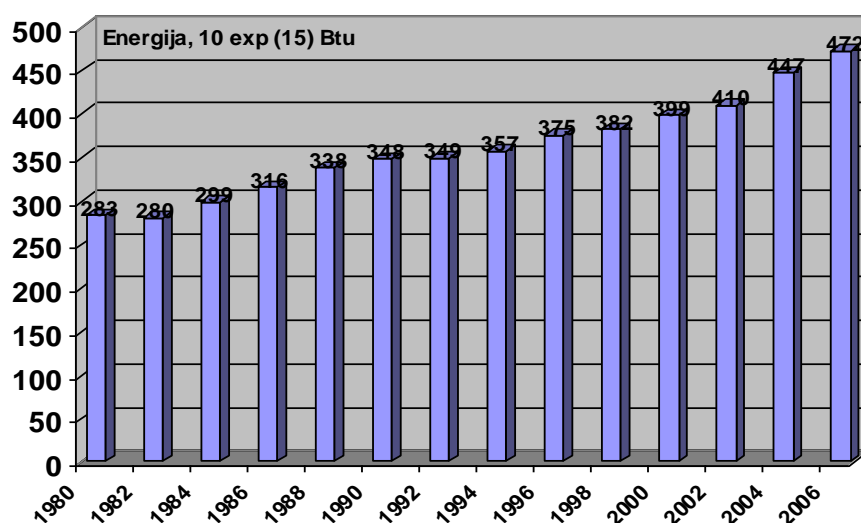
Vrsta izvora	1960		1973		2005		2020	
	Gten	%	Gten	%	Gten	%	Gten	%
Ugalj	1,39	42,2	1,50	24,4	2,89	25,3	3,35	25
Nafta	1,00	30,1	2,83	46,2	4,00	35,0	3,74	27,94
Prirodni gas	0,32	9,7	0,98	16,0	2,37	20,7	3,15	23,53
Nuklearna energija	0	0	0,055	0,90	0,72	6,30	0,89	6,62
Hidroelektrična energija	0,14	4,2	0,11	1,80	0,25	2,20	0,69	5,15
Obnovljivi izvori energije	0,45	13,8	0,65	10,70	1,21	10,50	1,58	11,76
<b>Ukupno</b>	<b>3,3</b>	<b>100</b>	<b>6,13</b>	<b>100</b>	<b>11,44</b>	<b>100</b>	<b>13,4</b>	<b>100</b>

(ten - tona ekvivalentne nafte, 1 ten =  $4,1868 \cdot 10^{10}$  J)

Struktura primarne svetske proizvodnje prema energetske izvora ukazuje na okretanje ka čistijim, obnovljivim energetske izvora, kao i prirodnom gasu, odnosno smanjenju učešća konvencionalnih energetske izvora. Primat u primarnoj proizvodnji i dalje ima nafta, ali je porast proizvodnje najviše ostvaren kod prirodnog gasa. U Srbiji, u 2004. godini, ukupna proizvodnja primarne energije iznosila je 13,56 Mten, a proizvodnja finalne energije 7,61 Mten. U periodu posle 2000. godine, nakon velikih oscilacija u kretanju energetske proizvodnje uslovljenih teškom ekonomskom situacijom u zemlji, došlo je do porasta proizvodnje i potrošnje primarne i finalne energije, ali još uvek nije dostignut nivo proizvodnje iz 1990. godine od 25 Mten. Struktura primarne energetske proizvodnje u našoj zemlji ukazuje na dominantno učešće uglja od oko 80% [12]. Obnovljivi izvori energije predstavljaju perspektivne izvore u našoj zemlji, ali za sada nemaju veći značaj u ukupnom energetske bilansu zemlje [14]. Po pitanju energenata Srbija je zavisna od uvoza, posebno kada su u pitanju tečna goriva. Smatra se da će uvoz i dalje rasti ukoliko se politikom Vlade u oblasti energetike ne stvore uslovi za smanjenje uvoza, i to pre svega stimulacijom korišćenja preostalih domaćih energetske resursa, korišćenjem obnovljivih izvora energije i povećanjem energetske efikasnosti [15].

Usled značajnog industrijskog i privrednog razvoja, porasta broja stanovništva i naglog razvoja društva uopšte, došlo je do značajnog porasta potrošnje energije uprkos izraženim negativnim uticajima na životnu sredinu. Od kraja XIX veka potrošnja energije je rasla po relativno visokim stopama rasta. U periodu od 1870. do 1970. godine potrošnja energije je povećana 32 puta sa prosečnom stopom rasta od 3,5% [12]. Ovakvo stanje je dovelo do brzog iscrpljivanja pronađenih energetske izvora, odnosno do intenzivnog istraživanja i eksploatacije novih energetske resursa. Tu je i doprinos "energetske krize" jer je omogućila intenzivan razvoj politike racionalnog korišćenja i štednje energije, kao i prestrukturiranje potrošnje uz značajan razvoj istraživanja i ulaganja u energetske privredu u mnogim zemljama sveta.

Na slici 1.1. prikazan je hronološki porast potrošnje energije u svetu u periodu od 1980. do 2006. godine [16].



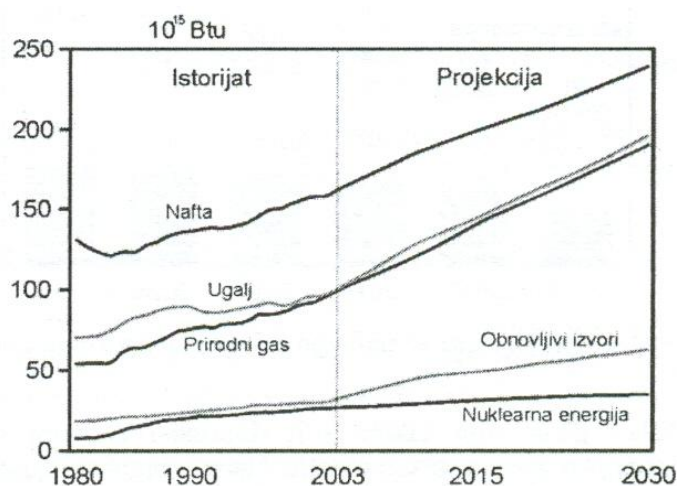
Slika 1.1. Svetska potrošnja primarne energije u periodu 1980-2006. god. [16]

(1 Btu = 1055,06 MJ = 2,52 · 10<sup>-8</sup> Mten )

Ukupna svetska potrošnja energije u 2006. godini iznosila je 472 · 10<sup>15</sup> Btu, odnosno 11,9 Gten. Analiza energetske resursa zemalja u svetu ukazuje da 79% čovečanstva živi u delu sveta u razvoju raspoložuci sa 30% globalne potrošnje energije, dok više od 2 milijarde ljudi u svim regionima ne raspolaze energijom, čak ni za svoje potrebe. Da bi

današnja svetska populacija imala istu prosečnu potrošnju energije po stanovniku, svetska proizvodnja energije treba da se poveća četiri puta [11]. Razvijene zemlje, uključujući i zemlje van OECD-a („The Organization for Economic Cooperation and Development“), troše oko 60% ukupne energije u svetu, a u ukupnoj strukturi stanovništva čine samo oko 25%. Zemlje u razvoju danas troše oko 40% od ukupne svetske potrošnje energije. Naime, najveći porast energetske potrošnje ostvaren je u Kini – prosečna godišnja stopa rasta iznosi 5,55% u poslednjih 25 godina. U 2004. godini potrošnja finalne energije u svetu imala je sledeću strukturu po sektorima – industrija 41,4%, transport 1,8% i ostali sektori široke potrošnje 56,8% [13]. Upravo zbog ovakvog stanja u svetskoj potrošnji energije korišćenje čistijih, obnovljivih izvora energije treba da oblikuje budući razvoj energetike i društva. Ukupna svetska potrošnja obnovljivih izvora energije u 2007. godini iznosila je 1,23 Gten [13], a procenjuje se da će energetske potrebe u 2050. god. biti oko 20 Gten [12].

Na osnovu podataka Američke administracije za energetske informacije o raspodeli potrošnje energije po tipu, prikazanih na slici 1.2., može se videti da iako se očekuje značajan porast potrošnje energije iz obnovljivih izvora predviđen je ipak brži porast potrošnje energije iz neobnovljivih izvora, kao što su nafta, uglj i prirodni gas. Podaci jasno ukazuju da će i u periodu do 2030. godine najznačajniji izvor energije biti sirova nafta [4].



Slika 1.2. Svetska potrošnja energije po tipu energije za period 1980–2030. god. [4]

Analiza učešća pojedinih energenta u potrošnji primarne energije u Srbiji, u periodu od 1990. god. do danas, ukazuje na to da najveći udeo ima uglj, zatim nafta, prirodni gas, a najmanji hidroenergija [12]. Ukoliko se razmatra potrošnja finalne energije po vrstama

može se reći da u Srbiji primat imaju tečna goriva, zatim električna energija, gasovita goriva i na kraju čvrsta goriva. U 2004. godini ukupna potrošnja finalne energije iznosila je 7,31 Mten, sa sledećom strukturom – tečna goriva 38,11%, električna energija 29,17%, gasovita goriva 20,50% i čvrsta goriva 12,22% [12].

Srbija raspolaže značajnim potencijalima obnovljivih energetskih izvora, ali su oni još uvek na nivou niskog stepena, odnosno stepena lokalnog korišćenja. Ukupan energetski potencijal svih obnovljivih izvora energije u Srbiji je oko 3 Mten godišnje, pri čemu obnovljiva poljoprivredna i šumska biomasa predstavlja 80% od ukupne obnovljive energije. U tabeli 1.2. prikazan je energetski potencijal biomase u Srbiji koji iznosi oko 108.000 TJ godišnje (odnosno 2,58 Mten) [12]. Od te količine 65.000 TJ (~1,68 Mten) godišnje predstavlja energetski potencijal od poljoprivredne biomase, dok je oko 43.000 TJ (~1,0 Mten) godišnje energetski potencijal šumske biomase. Od navedenih potencijala trenutno se za proizvodnju energije koristi svega oko 1,5% ukupne godišnje proizvodnje biomase, ali postoje određeni trendovi i državne aktivnosti koje podržavaju i promovišu efikasnije korišćenje biomase. Naime, u 2001. god. država je usvojila plan nacionalne energetske efikasnosti koji promoviše korišćenje obnovljivih izvora energije. Jedan od postavljenih prioriteta je povećanje korišćenja energije biomase sa tadašnjih 1% na 4,5% do 2010. godine, kao i povećanje energetske efikasnosti za 20% do 2010. godine [15]. Ovi prioriteti su ugrađeni i u nacionalni Zakon o energiji koji je usvojen 2004. godine [9].

Tabela 1.2. Prosečan energetski potencijal biomase u Srbiji [12]

Vrsta	Struktura	Energetski potencijal, TJ/god	Ukupno, TJ/god
drvena biomasa	drvo za grejanje	10.000	42.500
	drvni šumski otpad	23.000	
	drvni otpad iz industrije	2.800	
	vanstatistička seča	6.700	
poljoprivredna biomasa	ratarstvo	40.000	65.000
	voćnjaci i vinogradi	25.000	
<b>Ukupno</b>			<b>107.500</b>

Na osnovu svega rečenog može se videti da se svet susreće sa rastućim trendom potrošnje i potrebe energije, kao posledice demografske ekspanzije i privrednog razvoja. S obzirom na to da su klasična fosilna goriva iscrpljiva i da negativno utiču na životne

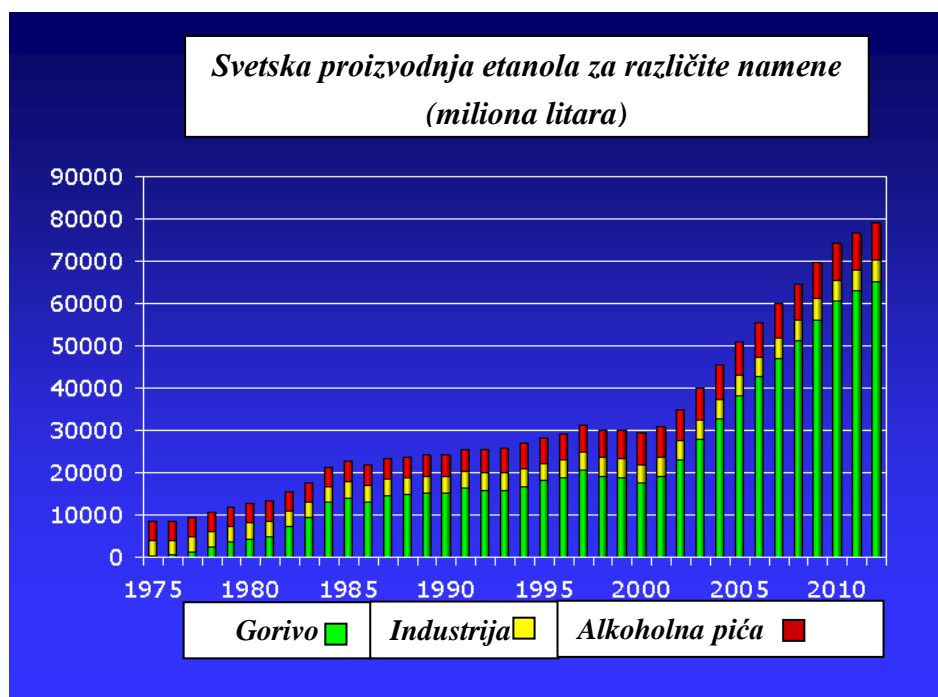
sredinu, neophodno je poštovati koncept održivog razvoja koji obezbeđuje povećanje racionalnog korišćenja postojećih energetske resursa, kao i pronalaženje obnovljivih, alternativnih izvora energije. Među alternativnim izvorima energije značajno mesto zauzimaju biogoriva, među kojima je značajan bioetanol kao obnovljivo i ekološki pogodno gorivo namenjeno za supstituciju motornog benzina. Razlozi koji utiču na povećanje korišćenja biogoriva su: neprekidni porast potrošnje energije do 2030. godine, a naročito u sektoru transporta, visok porast cena sirove nafte, politička nestabilnost u zemljama koje su veliki proizvođači sirove nafte, dominantna primena motora sa unutrašnjim sagorevanjem, i kompatibilnost biogoriva sa distributivnom mrežom motornih goriva, kao i pozitivan ekološki aspekt (smanjenje efekta staklene bašte) kao jedan od vodećih aspekata i u budućnosti.

## **1.2. PROIZVODNJA BIOETANOLA KAO GORIVA U SVETU I KOD NAS - STANJE I PERSPEKTIVE**

Pod *gorivom* se podrazumeva sagorljiva supstancija koja pri hemijskoj reakciji oksidacije, ili nuklearnoj reakciji fisije ili fuzije atomskog jezgra, oslobađa toplotu [17]. ***Biogoriva*** predstavljaju tečna ili čvrsta goriva koja se mogu proizvesti iz biomase i generalno imaju pozitivne efekte na zaštitu životne sredine (smanjuju emisiju CO<sub>2</sub>). U odnosu na konvencionalna goriva koja su po hemijskom sastavu uglavnom ugljovodonici, biogoriva imaju zastupljeno manje ili više kiseonika pa se još nazivaju i oksigenovana goriva (oksigenatori). ***Bioetanol*** je jedan od značajnih alternativnih, obnovljivih izvora energije koji spada u biogoriva (pored biodizela, biometanola i dr.). Dobija se fermentacijom iz obnovljivih sirovina, tačnije fermentacijom šećera prisutnih u biomasi ili šećera dobijenih prethodnom enzimskom konverzijom sastojaka biomase. Značajan je supstituent fosilnog goriva i u mnogim zemljama se već koristi kao dodatak motornom benzinu, te je svrstan u strateške sirovine.

Osnovna namena etanola može se svrstati u tri oblasti: a) za korišćenje u industriji kao sirovina ili rastvarač, b) za proizvodnju alkoholnih pića, i c) kao gorivo (slika 1.3.) [5]. Najstariju tradiciju ima proizvodnja etanola za alkoholna pića, a

najveća po kapacitetu u svetu je proizvodnja etanola kao goriva [4]. U 2007. godini, 73% od ukupno proizvedenog etanola u svetu koristilo se za gorivo, 17% za alkoholna pića i 10% u industrijske svrhe [18]. Etanol se može proizvesti hemijskom sintezom ili fermentacijom. Od ukupne proizvodnje etanola u svetu preko 60% se proizvodi putem fermentacije [19].



Slika 1.3. Obim svetske proizvodnje bioetanola za različite namene [5]

Naime, ideja o primeni etanola kao biogoriva nije nova. Korišćenje etanola kao goriva započeto je još 1860. godine kada je izumitelj motora Nikolaus Otto konstruisao četvorotaktni motor sa pogonom na etanol. Henry Ford je 1880. god. u jedan od svojih prvih automobila („kvadricikl“) ugradio motor takođe sa pogonom na etanol. Etanol kao gorivo koristio je i kasnije kod popularne T-serije njegovih automobila koji su proizvedeni u 15 miliona primeraka u periodu od 1908. do 1927. god. Pre tačno 100 godina, davne 1908. godine, Henry Ford je već uvideo mogućnost korišćenja biomase u proizvodnji bioetanola i značaj njegove primene kao goriva što pokazuje i ovaj citat: „Možemo dobiti gorivo iz voća, iz biljke sumah kraj puta, ili iz jabuka, korova, strugotine; skoro iz bilo čega...i ostaje na nekom da pronade kako se ovo gorivo može proizvesti komercijalno -

bolje gorivo po boljoj ceni nego što to znamo danas“ („We can get fuel from fruit, from the sumac by the roadside, or from apples, weeds, sawdust; almost anything...and it remains for someone to find how this fuel can be produced commercially - better fuel at a better price than we now know“) [20]. Postavlja se pitanje - da li je tokom prošlog veka zaista izvršen značajan napredak i u pronalaženju novih čistijih tehnologija i u zaštiti životne sredine? Da li se počelo na vreme s obzirom na to da je stanje u potrošnji energije, zagađenja životne sredine i porasta populacije već alarmantno? Etanol su kasnije potisnula jeftina goriva na bazi nafte koja su imala dominaciju sve do pojave naftne krize. U periodu naftnih kriza koristio se *gashol* koji je mešavina 10% etanola i 90% benzina. Stabilizacijom svetskog tržišta etanol je ponovo potisnut izuzev kod zemalja sa jeftinom šećernom sirovinom, kakav je slučaj u Brazilu. Suštinski obrt u odnosu na etanol se dešava poslednjih godina kada se sve više pooštavaju zakonski propisi u pogledu emisije izduvnih gasova, i kada je dominantan ekološki aspekt primene bioetanola kao goriva.

U tabeli 1.3. je prikazana proizvodnja bioetanola u pojedinim zemljama sveta (prvih 15 najvećih proizvođača) u periodu od 2004. do 2007. godine [21, 22]. Kao što se može videti u tabeli 1.3. i na slici 1.3., svetska proizvodnja etanola je u 2007. godini iznosila oko 50 milijardi litara. Od 2000. god. dolazi do postepenog porasta ukupne proizvodnje, a prema dugoročnoj proceni svetska proizvodnja bioetanola bi bila oko 80 Gl u 2010. godini (slika 1.3.) [5]. Ukupna proizvodnja etanola u 2006. god iznosila je oko 46 Gl, od čega oko 33 Gl etanola se koristilo kao gorivo, a ostatak za alkoholna pića i u industriji. Ova količina etanola kao goriva predstavljala je 2% od tadašnje ukupne potrošnje benzina u svetu [23].

Glavni proizvođači etanola u svetu u 2007. godini su Brazil i SAD, koji zajedno proizvode 88% od ukupne svetske proizvodnje (tabela 1.3.) [21, 22]. Pre oko 10 godina svega nekoliko zemalja je proizvodilo etanol za gorivo. U 2003. godini broj zemalja u svetu koje proizvode etanol kao gorivo se povećao na 13, a prema predviđanjima očekuju se značajne investicije u nova postrojenja u Americi, Evropskoj Uniji kao i u Indiji, Tajlandu, Kini, Australiji i Japanu [5].

Tabela 1.3. Proizvodnja bioetanola u pojedinim zemljama sveta (TOP 15) u periodu od 2004. do 2007. godine [21, 22]



Ukupna proizvodnja bioetanola, miliona litara/god							
Rang	Zemlja	2004	2005	2006	Rang	Zemlja/Region	2007
1	SAD	13.380	16.142	18.378	1	SAD	24.600
2	Brazil	15.100	16.000	17.000	2	Brazil	19.000
3	Kina	3.650	3.800	3.850	3	EU	2.160
4	Indija	1.749	1.700	1.900	4	Kina	1.840
5	Francuska	829	908	950	5	Kanada	800
6	Nemačka	269	432	765	6	Tajland	300
7	Rusija	750	750	647	7	Kolumbija	284
8	Kanada	231	230	579	8	Indija	200
9	Španija	300	352	462	9	Centralna Amerika	150
10	Južna Afrika	416	390	386	10	Australija	100
11	Tajland	280	300	352	11	Turska	60
12	Velika Britanija	401	348	280	12	Pakistan	35
13	Ukrajna	250	246	269	13	Peru	30
14	Poljska	200	219	250	14	Argentina	19
15	Saudijska Arabija	300	121	197	15	Paragvaj	18
	<b>Ukupno</b>	<b>38.105</b>	<b>41.938</b>	<b>46.265</b>		<b>Ukupno</b>	<b>49.596</b>

Razlozi za svetski trend povećanja korišćenja bioetanola kao goriva su: velika raspoloživost biomase kao sirovine za proizvodnju etanola, manji negativni efekti na životnu sredinu od efekata koje imaju naftna goriva ili iz nafte izvedeni dodaci gorivima (smanjenje emisije CO<sub>2</sub>), smanjenje zavisnosti od uvoza nafte i njenih derivata u zemljama koje ne proizvode naftu, povećanje stope zaposlenosti, razvijanje ruralnih zajednica itd. [4]. Jedan od razloga je i što etanol ima pozitivan neto energetske bilans, odnosno energija koja je sadržana u toni etanola veća je od energije potrebne da se ona proizvede [5]. Prema podacima koje je Grassi [24] prikazao u svom radu odnos energije output-a i input-a za proces proizvodnje bioetanola iz kukuruza iznosi 1,30, što znači da za svaku jedinicu energije unete u proces dobija se 30% energije više. Ukoliko se kao sirovina koristi šećerna trska taj odnos je mnogo veći, u opsegu od 2,5-10,2. Za benzin odnos energije output/input

je 0,805 (za svaku jedinicu energije koja se iskoristi za proizvodnju benzina dobija se 19,5% manje energije - negativan neto energetske bilans). [20].

U tekstu koji sledi najviše pažnje posvećeno je Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Brazilu, kao najvećim proizvođačima i potrošačima bioetanola kao goriva, ali i ostalim značajnim proizvođačima etanola u svetu, kako bi se sagledalo trenutno stanje i razmotrile mogućnosti za budući razvoj i primenu biogoriva u skladu sa održivim razvojem.

### 1.2.1. Severna i Latinska Amerika

U *SAD*-u, kao najvećem proizvođaču etanola u svetu predviđa se izuzetno veliki dalji rast proizvodnje etanola kao goriva. Procenjuje se da će proizvodnja etanola sa sadašnjih 6,5 milijardi galona (oko 25 milijardi litara) porasti do 2015. godine na oko 15 milijardi galona [21, 22]. Ipak, i trenutna proizvodnja koja je velikog obima predstavlja samo 4% od ukupne količine benzina koja se troši u *SAD*-u. Glavna sirovina za proizvodnju etanola u *SAD*-u je kukuruz (oko 90% bioetanola se proizvodi iz kukuruza) [20]. Koriste se smeše sa dodatim manjim procentom etanola motornom benzinu (10% vol.), dok Brazilski program (ProAlcohol) promoviše korišćenje smeša sa većom količinom etanola [4]. Naime, nekoliko proizvođača motornih vozila, kao što su Ford, Chrysler i GM, prodaju fleksibilna vozila koja mogu koristiti benzin ili različite smeše etanola i benzina (do 85% udela etanola). Trenutno postoji 1.587 stanica koje distribuiraju bioetanol kao gorivo [25]. U oktobru 2008. god. pušten je u rad prvi „biogorivo koridor“ duž međunarodnog autoputa u centralnoj oblasti *SAD*-a (od severa Indijane do juga Alabame) koji sačinjava više od 200 stanica koje snabevaju vlasnike „fleks“ vozila bioetanolom [26].

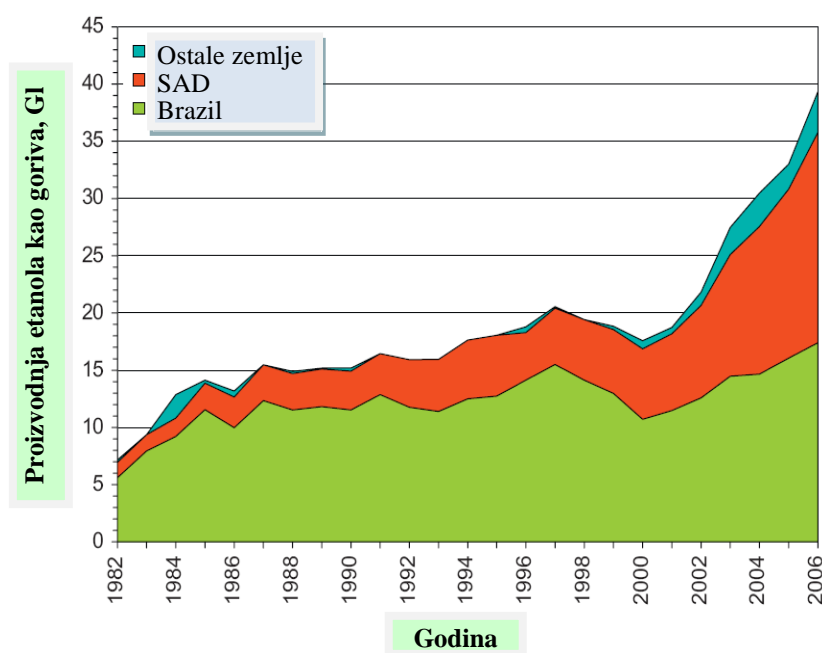
Kako bi se promovisala sve veća proizvodnja i upotreba biogoriva (i smanjilo korišćenje i uvoz fosilnih goriva) u *SAD*-u su razvijene i uvedene različite zakonske regulative i nacionalni planovi. Jedan od najznačajnijih koraka je uvođenje nacionalnog plana „Energy Policy Act“ u 2005. god. (EPAAct 2005) koji sadrži brojne mere vezane za energetske efikasnost, modernizaciju energetske infrastrukture i promociju korišćenja obnovljivih izvora energije. Takođe, ovaj plan podrazumeva potpunu saradnju između

vlade, industrije i akademskih institucija kako bi se dalje razvijale tehnologije za proizvodnju biogoriva. U članu XV ovog akta uključeni su i Standardi za obnovljiva goriva prema kojima se zahteva da se 15 Gl godišnje etanola meša sa benzinom do 2006. god., a do kraja 2012. god. da ova cifra poraste na 28,4 Gl/god. Nekoliko država je preduzelo ozbiljne korake u razvijanju tehnologija i povećanju korišćenja biogoriva, među kojima se izdvaja Kalifornija. U zajedničkom izveštaju pod nazivom „Smanjenje zavisnosti od nafte u Kaliforniji“ (Reducing California's Petroleum Dependency) koje su podnele dve agencije (California Energy Commission CEC i California Air Resources Board) u 2003. godini, predlaže se da do kraja 2020. godine alternativna goriva čine 20% od ukupne količine goriva koja se koristi u sektoru transporta, a 30% do kraja 2030. godine. Kako bi se „agresivnije“ nastavilo sa smanjenjem korišćenja fosilnih goriva, 2007. godine donet je Zakon o energetske nezavisnosti i sigurnosti (Energy Independency and Security Act) koji predlaže mnogo strožije standarde za obnovljiva goriva u poređenju sa planom iz 2005. god. Među ovim standardima je i taj da se dostigne proizvodnja od 132,5 Gl godišnje do kraja 2020. god. (od čega skoro 50% moraju biti biogoriva dobijena iz nejestivih, lignoceluloznih sirovina) [27].

**Brazil** je jedan od vodećih svetskih proizvođača etanola kao goriva iz šećerne trske, sa proizvodnjom od oko 19 milijardi litara godišnje u 2007. godini (tabela 1.3.). Trenutno postoji 325 fabrika koji prerađuju 425 miliona tona godišnje šećerne trske, od čega jedna polovina se koristi za proizvodnju šećera a druga za proizvodnju etanola. Etanol proizveden u Brazilu zamenjuje oko 1,5% od ukupno korišćenog benzina u svetu. Ukoliko se nastavi sadašnja stopa rasta proizvodnje etanola u Brazilu i ako ostale zemlje delimično prate etanol program usvojen u Brazilu, moguće je da se 10% od ukupno korišćenog benzina u svetu zameni etanolom u sledećih 15-20 godina [28]. Od ukupno proizvedenog etanola u Brazilu oko 20% se izvozi u SAD, EU i na ostala tržišta. Od 2006. god. Brazil je jedina zemlja koja ne uvozi bioetanol i koja je potpuno zavisna samo od svojih postojećih kapaciteta proizvedenog bioetanola. U Brazilu prosečan odnos energije output-a i input-a iznosi 9,2 [24]. Tipični brazilski „fleks“ modeli automobila različitih proizvođača mogu koristiti smešu etanola i benzina od E20-E25 do čistog E100 goriva [29, 30].

Ukoliko se uporedi proizvodnja bioetanola u SAD-u i Brazilu, može se reći da je brazilaska proizvodnja ovog goriva zasnovana na šećernoj trsci mnogo efikasnija nego proizvodnja u SAD-u. Cena proizvodnje bioetanola u Brazilu iznosi 22 centa/l, a u SAD-u

35 centa/l. Ono što povećava troškove proizvodnje etanola iz kukuruza je neophodan proces konverzije skroba do fermentabilnih šećera. Međutim, jedna od prednosti proizvodnje etanola iz kukuruza u SAD-u je mogućnost vraćanja jedne trećine sirovine na tržište u vidu džibre koja se može koristiti kao stočna hrana. Ukupna obradiva zemlja u Brazilu je 355 miliona hektara, a u SAD-u 270 miliona hektara; od toga se 1% od ukupne obradive površine koristi za šećernu trsku u Brazilu, a 3,7% se koristi za uzgajanje kukuruza u SAD-u. U Brazilu je ostvarena produktivnost od 6.800-8.000 litara etanola po hektaru, a u SAD-u 3.800-4.000 litara etanola po hektaru. Odnos energije output-a i input-a u Brazilu iznosi od 8,3 do 10,2, a u SAD-u je mnogo manji, od 1,3 do 1,6. Prosečna redukcija emisije gasova staklene bašte u Brazilu i SAD-u je 86-90% i 10-30%, respektivno [28, 31, 32]. Na slici 1.4. prikazana je proizvodnja etanola kao goriva u SAD-u i Brazilu, kao i ukupna svetska proizvodnja, u periodu od 1982. do 2006. godine [23].



Slika 1.4. Proizvodnja etanola kao goriva u SAD-u, Brazilu i u svetu, u periodu od 1982. do 2006. god. [23]

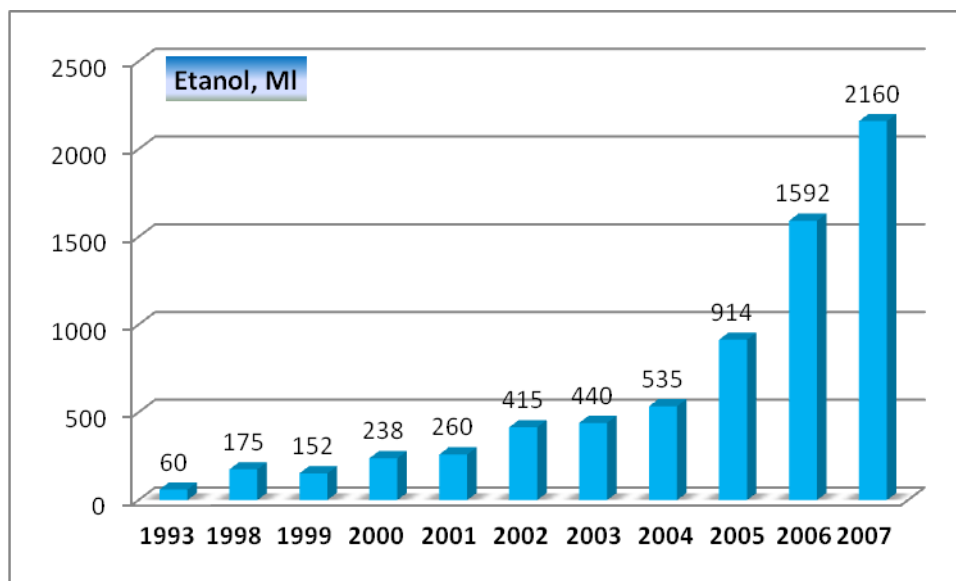
**Kanada** takodje promovise primenu i proizvodnju etanola, i to na bazi lignoceluloznih sirovina (razna drvena biomasa). Prema Kanadskom planu do 2010. god. ce se ostvariti proboj E10 smeša na 35% tržišta, što podrazumeva proizvodnju etanola od oko 1,33 GJ godišnje. Prema sadašnjem stanju, postrojenja za proizvodnju bioetanola su

locirana uglavnom u oblasti Ontario, mada su u planu investicije u nova postrojenja. Kanadska vlada je 1. aprila 2005. god. donela akt o obaveznom korišćenju etanola kao dodatku goriva u količini od 7,5% na gorivo. Ovo je podstaklo na nove investicije u proizvodnju, pa se planira izgradnja 400 miliona litara novih kapaciteta za proizvodnju bioetanola kao goriva [4].

**Peruanska** vlada je 2002. godine najavila da zemlja pretenduje da bude jedan od vodećih izvoznika etanola, pa stoga planira izgradnju i do 20 destilerija, a kao sirovina bi se koristila šećerna trska. Da bi podržala ovaj plan, država namerava da zaseje oko 240.000 ha zemljišta (koje je sada pokriveno džunglom) šećernom trskom [4]. Etanol program u **Kolumbiji** je započeo 2002. godine, nakon donetog zakona kojim se planira da se ostvari supstitucija goriva etanolom do 10%, u gradovima većim od 500.000 stanovnika do kraja 2006. god. Da bi to ostvarila Kolumbija bi morala da skoro udvostruči proizvodnju bioetanola na šećernoj trsci. Momentalno država stimuliše proizvodnju bioetanola na šećernoj trsci smanjenjem taksa [4].

### 1.2.2. Evropska Unija

Proizvodnja bioetanola kao goriva u Evropskoj Uniji u periodu od 1993. do 2007. god. prikazana je na slici 1.5. [23, 33]. Sa slike 1.5. se može videti da poslednjih godina dolazi do velikog porasta u proizvodnji etanola u Evropskoj Uniji, s obzirom da se 1993. god. proizvodilo svega 60 miliona litara, a 2007. god. 2.160 milona litara. Razlozi za ovakav trend povećanja proizvodnje etanola (pored usvojenih Direktiva Evropske Unije) su znatno povećana proizvodnja u Francuskoj usled olakšica koje nudi država, povećana upotreba vinskog alkohola kao sirovine i izgradnja novih postrojenja velikih kapaciteta u Nemačkoj [33].



Slika 1.5. Proizvodnja etanola kao goriva u Evropskoj Uniji u periodu 1993-2007. god.

[23, 33]

Najveći proizvođači etanola u Evropi su Francuska, Nemačka, Španija i Švedska. Među vodećim proizvođačima poslednje dve godine izdvajaju se i Italija i Poljska. U tabeli 1.4. može se videti da se stanje u borbi za prvo mesto u proizvodnji etanola kao goriva veoma brzo menja. Tokom devedesetih godina XX veka vodeća zemlja u proizvodnji je bila Francuska [4], zatim od 2000. do 2005. god. Španija, a u 2006. god. Nemačka [33]. U 2007. god. najveći proizvođač je Francuska (1.150 Ml), koju slede Nemačka, Španija i Italija [23]. Očekuje se otvaranje novih postrojenja ukupnog kapaciteta od 4 Gt u 15 zemalja EU; najveća dodatna proizvodnja se očekuje u Francuskoj (550 Ml), zatim u Nemačkoj (480 Ml), Holandiji (480 Ml), Belgiji (435 Ml), Španiji (420 Ml), Velikoj Britaniji (400 Ml) i Češkoj (339 Ml) [23]. U EU se samo mali deo od ukupno proizvedenog etanola koristi kao gorivo. U 2005. godini ukupna proizvodnja etanola u EU iznosila je 2,7 Gt, a svega oko 38% se koristilo kao gorivo. Važno je naglasiti da pored značajne proizvodnje etanola postoji i izuzetno velika potrošnja ovog goriva. Naročito, Švedska, Nemačka i Velika Britanija imaju veliku potrošnju etanola u odnosu na njegovu proizvodnju, pa se samim tim ističu na tržištu i kao veliki uvoznici ovog energenta [23, 33].

Tabela 1.4. Proizvodnja i potrošnja etanola kao goriva u pojedinim zemljama EU od 2005. do 2007. god. [23, 33]

Zemlja	Proizvodnja etanola kao goriva, MI			Potrošnja etanola kao goriva, MI		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007
Francuska	144	250	1150	147	290	536
Nemačka	165	431	706	283	600	575
Španija	303	402	521	221	224	220
Švedska	153	140	147	283	320	356
Italija	8	128	302	10	0	0
Poljska	64	120	133	55	103	167

Sirovine koje se najčešće koriste su pšenica, šećerna repa i kukuruz. Posljednjih godina ističe se i vinski alkohol (vino) koji se kao sirovina jedino koristi u Evropi, i to u značajnim količinama. Naime, u 2005. god. 26% proizvedenog etanola dobijeno je iz vina [33]. U Francuskoj i Španiji etanol se koristi u vidu ETBE (etil tercijerni butiletar) kao dodatak gorivu, dok npr. u Švedskoj se koriste smeše sa dodatkom bioetanola benzinu u količini od 10% vol.

U 2003. godini u Evropskoj Uniji su u cilju promovisanja korišćenja biogoriva i drugih alternativnih goriva za drumski transport usvojene dve direktive [8]:

- *Direktiva 2003/30/EC* kojom se zahteva od zemalja članica da proizvedu ili obezbede na tržištu minimalne količine biogoriva kojim bi se zadovoljili ciljevi da se do kraja 2005. godine obezbedi zamena od 2% fosilnih goriva, a do kraja 2010. od 5,75 % mereno u odnosu na sadržaj energije. Takođe se zemlje članice obavezuju da od 2004. godine daju godišnje izveštaje o akcijama na tom planu [8],
- *Direktiva 2003/96/EC* koja omogućuje zemljama članicama EU da primene različite takse na ova goriva u cilju podsticanja razvoja biogoriva. Do 2002. godine devet zemalja EU (Austrija, Češka, Francuska, Nemačka, Italija, Poljska, Španija, Švedska i Velika Britanija) kompletno ili delimično su se oslobodili od takse biogoriva [34].

Osnovni ciljevi navedenih evropskih direktiva su:

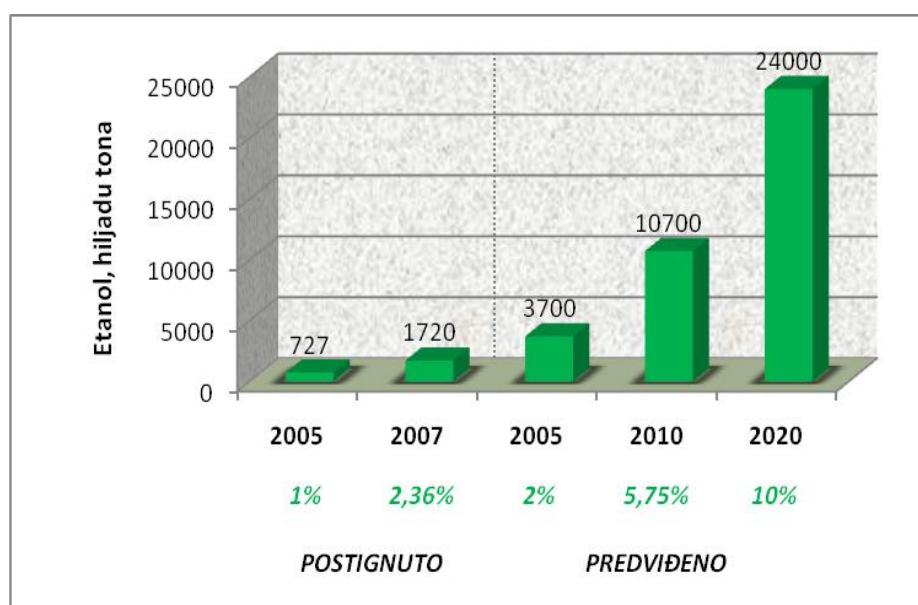
- Da se pomogne oslobađanju EU od zavisnosti od eksternih izvora goriva. Naime trenutno EU uvozi oko 50% energije, što može do 2030. godine dostići 70%. Što se tiče nafte, zavisnost EU od uvoza se može do 2020. godine povećati na 90% [8]
- Da se ostvare ciljevi Kjoto sporazuma (potpisanog 1997. god.) i smanji emisija gasova koji doprinose efektu staklene bašte. Od šest gasova koji utiču na efekat staklene bašte najveća pažnja se posvećuje CO<sub>2</sub>. Prema Kjoto sporazumu potrebno je u periodu od 2008-2012. god. smanjiti emisiju CO<sub>2</sub> za 5,2% u odnosu na stanje iz 1990. godine. Nasuprot ovome, ukoliko se ništa ne bi preduzimalo i ukoliko bi se zadržao postojeći trend emisije CO<sub>2</sub>, predviđa se da bi do 2010. god. emisija CO<sub>2</sub> mogla da poraste za 50% [35]
- Da se ide dalje ka ostvarenju od 20% zamene tradicionalnih goriva u drumskom transportu do 2020. godine [4]

Važno je naglasiti da se gore navedena direktiva 2003/30/EC najviše odnosi na goriva koja se koriste u drumskom transportu, jer se smatra da ova goriva učestvuju sa više od 85% u ukupnom transportu u EU [36].

Ako se posmatraju postojeći kapaciteti u svetlu donesene deklaracije očigledno je da je neophodno da EU preduzme energične korake u smislu povećanja kapaciteta za proizvodnju etanola [37]. Naime, cilj da se do kraja 2005. godine obezbedi zamena od 2% fosilnih goriva prema Direktivi 2003/30/EC do sada nije ispunjen. Udeo biogoriva iznosio je samo 0,5%, 0,6%, 1% i 2,36% u 2003., 2004., 2005. i 2007. god., respektivno (slika 1.6.). U periodu od 2003. do 2005. god. deset zemalja čak nije koristilo ni biodizel ni bioetanol kao gorivo. Dve zemlje sa najvišim udelom u 2005. god. su Nemačka (3,75%) i Švedska (2,23%) [23]. Takođe, pomenuta procena da će biogoriva zameniti 20% tradicionalnih goriva do 2020. god. već se sada smatra nerealnom, pa je na osnovu postojećeg trenda rasta proizvodnje i primene bioetanola u EU u „Dokumentu energetske politike“ (Energy Policy Document) donetom u januaru 2007. godine usvojena blaža procena od 10% zamene tradicionalnih goriva [23]. Ovo se još jasnije može videti sa slike 1.6. u kojoj je kvantitativno predstavljena potrebna proizvodnja etanola u EU koja bi zadovoljila ciljeve deklaracije u 2005., 2010. i 2020. godini (prikazana kalkulacija je



bazirana na pretpostavci da su sve članice EU-25 u potpunosti posvećene ciljevima deklaracije) i postignuta proizvodnja bioetanola u 2005. i 2007. godini [8, 23, 33]. U svom radu de Miguel procenjuje da ako bi postignuta proizvodnja etanola u 2005. god. (727 kt) porasla na previđenih 10.700 kt u 2010. god. neophodno je izgraditi 40 novih postrojenja prosečnog kapaciteta od 250.000 tona i uložiti oko 6 milijardi evra (s obzirom da cilj ustanovljen deklaracijom u 2005. god. nije postignut) [33].



Slika 1.6. Proizvedene količine bioetanola u EU u 2005. i 2007. god. i potrebne količine bioetanola da bi se ostvarili ciljevi Direktive 2003/30/EC [8, 23, 33]

### 1.2.3. Azija

Većina zemalja Azije je zavisna od uvoza fosilnih goriva, pa samim tim ove zemlje intenzivno rade na promociji biogoriva. Najveći proizvođač etanola u Aziji je **Kina** (na trećem mestu u svetu) – ukupna proizvodnja iznosila je 1,84 Gt u 2007. god. (tabela 1.3.). Od ukupno proizvedenog etanola u 2005. god. svega oko 26% se koristilo kao gorivo. U Kini se nalazi najveće svetsko postrojenje za proizvodnju bioetanola kapaciteta 600.000 t/god. Sirovine koje se koriste su kukuruz, pirinač i ostale žitarice (više od 80%) i šećerna trska (oko 10%). Kina promovira program korišćenja bioetanola kao goriva od 2001.

godine. Ona planira da usmeri svoje viškove useva (procenjuju se na 10% od trenutne proizvodnje) u proizvodnju etanola i da se oslobodi zavisnosti od uvoznih goriva [4, 23, 38].

**Indija** je takođe počela sa programom alternativnih goriva. Januara 2003. god. država je uvela zakonsku obavezu korišćenja E5 smeše sa etanolom u devet država i 4 federalne oblasti, a kao odgovor na ovaj zakon planirana je izgradnja 20 postrojenja za proizvodnju i rekonstrukcija 10 postrojenja [4]. Ova zemlja je druga u svetu (posle Brazila) po proizvodnji etanola iz šećerne trske [23].

**Tajland** je sebi postavio za cilj da postane treći po veličini proizvođač bioetanola, posle Brazila i SAD-a. U skladu sa tim donet je i plan razvoja alternativnih goriva kojim poziva na supstituciju 970.000 tona nafte sa energetskim ekvivalentom bioetanola do kraja 2010. god. [4]. Povlačenjem iz upotrebe MTBE (metil tetra butiletra) proizvodnja etanola je u 2006. godini porasla za oko 20% (u odnosu na prethodnu godinu) i iznosila je 352 MI (tabela 1.3.) [23].

**Japan** takodje teži ka povećanju udela etanola u smešama sa motornim gorivom i planira povećanje proizvodnje biodizela, s obzirom da je jedan od najvećih potrošača benzina u svetu i veoma je zavisan od uvoza nafte. Godine 2005. Japan je bio drugi po redu uvoznik etanola (više od 500 MI), koji je najviše korišćen kao gorivo [23].

#### 1.2.4. Australija

Australijska vlada podržava proizvodnju i korišćenje alternativnih goriva sredstvima subvencija i smanjenja taksi. Australijski cilj je da do 2010. godine proizvede 280.000 tona etanola. Proizvodnja etanola u Australiji se uglavnom bazira na šećernoj trsci. Najviše se kao gorivo koristi smeša E10 (sa 10% vol. etanola) [4].

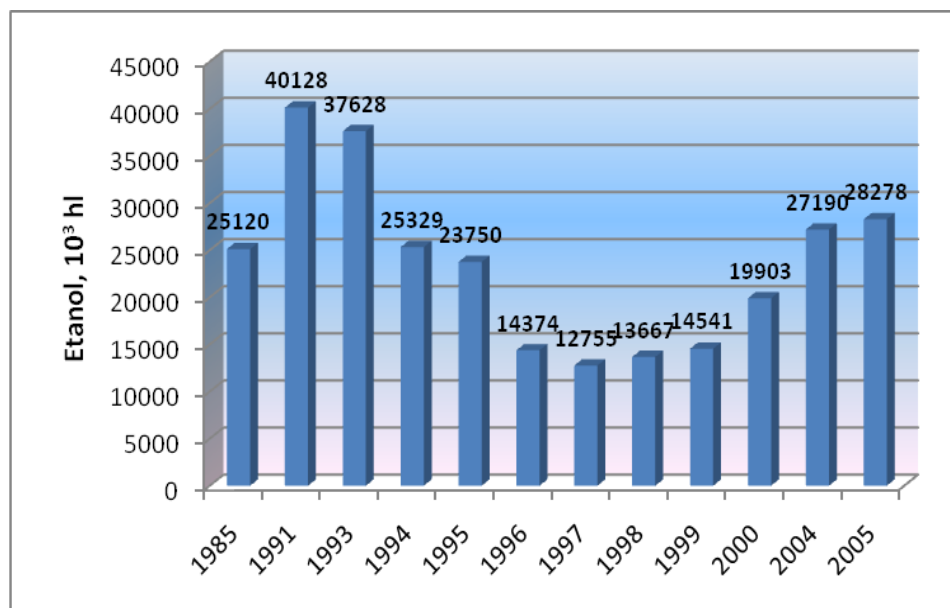
#### 1.2.5. Srbija

Prva postrojenja za proizvodnju etanola (malog kapaciteta od oko 1500 hl<sup>o</sup>/dan) postojala su još u vreme Austro-Ugarske na teritoriji današnje Vojvodine [4]. Značajniji

razvoj proizvodnje etanola u Srbiji nastao je tek nakon 1960. godine, kada je počela izgradnja većih industrijskih kapaciteta sa savremenom opremom i tehnologijom. U 1996. god. postojalo je 11 industrijskih pogona (10 proizvođača), čiji je zbirni dnevni tehnički kapacitet iznosio nešto preko 150.000 hl<sup>o</sup> što odgovara godišnjem kapacitetu od oko 48 miliona hl<sup>o</sup>/god pri radu od 320 dana godišnje (hl<sup>o</sup>=1 l apsolutnog alkohola) [39]. Proizvodnja etanola u našoj zemlji se danas bazira na melasi (oko 50%) i na žitaricama (oko 50%). Trenutno u Srbiji postoji 10 postrojenja za proizvodnju etanola, čiji su kapaciteti i korišćene sirovine prikazani u tabeli 1.5. [4]. Iz tabele 1.5. se može uočiti da je današnja proizvodnja etanola nešto manja nego 1996. godine i iznosi 40 miliona hl<sup>o</sup>/god pri radu od 320 dana godišnje. Prema prikazanim proizvodnim kapacitetima može se videti da su najveća tri pogona u Beogradu, Crvenki i Kovinu i predstavljaju 84% proizvodnog kapaciteta Srbije. U navedenim postrojenjima proizvodi se 96% vol. alkohol koji je namenjen uglavnom za alkoholna pića i u medicinske i farmaceutske svrhe. Važno je naglasiti da nijedno postrojenje ne raspolaže opremom za dehidraciju etanola.

Tabela 1.5. Postojeći kapaciteti za proizvodnju etanola u Srbiji [4]

<b>Postrojenje</b>	<b>Sirovina</b>	<b>Dnevni kapacitet, 10<sup>3</sup> hl<sup>o</sup></b>	<b>Godišnji kapacitet (320 radnih dana), 10<sup>3</sup> hl<sup>o</sup></b>
Panalko, Beograd	melasa	30	9.600
Crvenka, novi pogon	melasa	30	9.600
Crvenka, stari pogon	melasa i žitarice	15	4.800
Kadakas, Crvenka	žitarice i melasa	2	640
Kovin	melasa	30	9.600
Osečina	žitarice	4	1.280
Užice	žitarice i voće	5	1.600
Lukas, Bajmok	žitarice i melasa	1,2	384
Srbobran	žitarice i melasa	4	1.280
Takovo	žitarice i krompir	4	1.280
<b>UKUPNO</b>		<b>125,2</b>	<b>40.064</b>

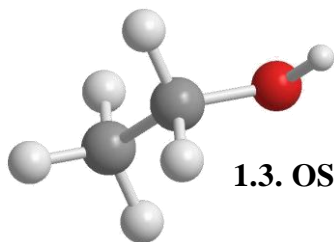


Slika 1.7. Godišnja proizvodnja etanola u našoj zemlji u periodu od 1985. do 2005. godine [40]

Kao što se može videti sa slike 1.7. [40], proizvodnja etanola u 2005. godini je skoro na nivou one koja je ostvarena 1985. godine, a znatno niža nego u 1991. godini. Ako se ovi podaci uporede sa svetskom proizvodnjom bioetanola koja je prikazana na slici 1.3., može se videti da je u svetu od 1985. godine do 2004. god. stanje u proizvodnji etanola dosta drugačije - proizvodnja je više nego udvostručena, sa daljim intenzivnim trendom rasta. Od 1985. godine do 1991. godine proizvodnja etanola u našoj zemlji je imala rastući trend, a zatim je počela da opada. Blagi porast proizvodnje koji je ostvaren od 1999. do 2005. god. ne odlikava realnost zbog prethodnog stanja sankcija, i naravno nedovoljan je da bi se pratile rastuće potrebe za ovim proizvodom i da bi se ostvarila njegova primena kao dodatka gorivu. Na žalost većina od navedenih postojećih kapaciteta danas ne radi efikasno iz različitih razloga. Neki od mnogobrojnih razloga su: ukupno stanje privrede, negativna zbivanja na planu ukupne proizvodnje, neadekvatni zakonski propisi, tranziciona kretanja, svrstavanje etanola pod zakonsku regulativu propisanu za vino i alkoholna pića, što praktično sužava mogućnost njegovog korišćenja za druge svrhe za koje se on u svetu koristi (hemijska industrija, gorivo), zatim loša državna politika u vezi strategije razvoja ove industrijske grane generalno, nemogućnost konsolidacije nakon perioda krize i stagnacije, u nekim slučajevima zastarelost opreme itd. [4].

Ukoliko bi proizvodnju etanola u našoj zemlji gledali kroz prizmu donešenih Direktiva Evropske Unije (2003/30EC i 2003/96/EC) predviđeni kapaciteti za 2005. god. su znatno viši od postojećih, a ciljevi za 2010. i 2020. god. praktično neispunjivi. Mojović i saradnici [4] su izvršili kalkulaciju procena potreba za bioetanolom u Srbiji koristeći podatke o potrošnji i potrebama za motornim benzinom, kao i minimalne količine bioetanola potrebne za supstituciju motornog benzina koje su propisane Direktivama. Naime, u 2005. god. potrebno je izvršiti supstituciju od 2% motornog benzina prema evropskoj Direktivi što bi podrazumevalo proizvodnju od 21.900 t etanola za gorivo u Srbiji. Tada bi ukupne potrebe za etanolom (u industriji, za alkoholna pića i kao gorivo) iznosile 73.900 t što je 3,3 puta više nego proizvedena količina etanola u toj godini od 22.000 t. Neophodna supstitucija motornog benzina u 2010. god. iznosi 5,75% pa je potrebno proizvesti 78.200 t etanola kao goriva. Tada bi pri nepromenjenim potrebama etanola za industriju i alkoholna pića ukupne potrebe za etanolom iznosile 130.200 t što je šest puta više od trenutne proizvodnje etanola u našoj zemlji. Na osnovu navedenog, u Srbiji je neophodno uvesti nova postrojenja za proizvodnju etanola – pogone velikog kapaciteta koji bi pored proizvodnje etanola uključivali i proizvodnju stočne hrane i ugljendioksida; ili uvesti mrežu manjih pogona za proizvodnju sirovog etanola (65-70% vol.) koji bi se dalje prerađivao u većim pogonima za rektifikaciju i obezvodnjavanje u okvirima naftne industrije [41].

Veoma je bitno naglasiti da danas u Srbiji ne postoji organizovana proizvodnja i potrošnja bioetanola kao motornog goriva, iako je naša zemlja uvoznik značajnog dela svoje potrošnje motornih goriva [4]. Na primerima drugih opisanih zemalja može se videti da za uvođenje ovakvih programa u energetska politiku odlučujuća je odluka i pomoć države. Prvi nagoveštaj uvođenja proizvodnje bioetanola za gorivo je najava izgradnje fabrike za proizvodnju bioetanola u Zrenjaninu (najveća srpska grinfild investicija vredna 380 miliona evra). Očekivana proizvodnja je 700.000 tona bioetanola, oko 450.000 tona stočne hrane i 100.000 tona đubriva sa 250 novih radnih mesta [42]. Na osnovu svega navedenog, naša država treba da donese odgovarajuće programe koji bi uključivali proizvodnju bioetanola za gorivo i supstituciju dela motornog goriva sa bioetanolom. Budući da se nalazimo u Evropi i opredeljeni smo za ulazak u EU verovatno bi mere trebalo da budu slične postojećim u EU na tom planu.



### 1.3. OSNOVNE KARAKTERISTIKE BIOETANOLA KAO GORIVA

Ime *alkohol* potiče od arapske reči *al-kohl* koja je označavala fini prašak za bojenje trepavica. Od Paracelsusa dalje se taj naziv koristi za svaki fini prašak ili destilovanu tečnost [43]. Etanol je čoveku bio poznat od davnina kada se koristio kao proizvod spontane fermentacije šećera. Vremenom čovek je naučio da process fermentacije kontroliše i da proizvodi alkoholna pića. Egipćani su poznavali ekstrakciju etanola nakon fermentacije i njihova znanja su preneti Arapima koji su izučavali destilaciju etanola u periodu od VII do XII veka. Mada je process usavršavanja postupka destilacije bio veoma spor, ipak je 1808. godine u Francuskoj izgrađeno prvo kontinualno postrojenje (sagradili su ga Cellier i Blumental). Razvojem organske hemijske tehnologije, u drugoj polovini XIX veka započinje industrijska proizvodnja etanola koji se koristi kao rastvarač, gorivo, antiseptik i sirovina za proizvodnju velikog broja organskih jedinjenja. Od II svetskog rata zbog velike potražnje počela je komercijalna proizvodnja sintetičkog etanola (u SAD-u iz etilena koji se dobijao iz otpadnih gasova od destilacije nafte). Nakon prve naftne krize preovladava sinteza etanola putem fermentacije [39].

Etanol (etil-alkohol ili samo alkohol) je tečnost bez boje, karakterističnog mirisa, zapaljiv i rastvorljiv u vodi i etiletru [43]. U zavisnosti od kvaliteta postoje:

- *denaturisani etanol* (88% vol.) namenjen je isključivo za gorenje i osvetljenje
- *industrijski etanol* (96,5% vol.) koji se koristi u industriji i za tehničke svrhe kao rastvarač, gorivo i kao sirovina u proizvodnji velikog broja hemijskih proizvoda
- *fini etanol* (96,0-96,5% vol.) koristi se u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji i za proizvodnju nekih alkoholnih pića
- *apsolutni etanol* (99,7-99,8% vol.) je termin za etanol koji nema vode i koji se koristi u farmaceutske svrhe i kao gorivo (ili oksigeni dodatak gorivima) [39]

Bioetanol se može koristiti kao supstituent motornom benzinu ili se može konvertovati do ETBE (etil-tercijarni butiletar) i kao takav dodavati benzinu ili dizel gorivu u koncentraciji do 15%. Kao dodatak gorivu koristi se isključivo visoko prečišćeni -

apsolutni etanol. Svaka zemlja ima standarde za kvalitet etanola namenjenog za dodatak benzinu ili dizelu. U ovim standardima limitirani su sadržaji: vode, metanola, aldehida, sumpora, fosfora, viših alkohola, bakra, hlorida i sredstava za denaturisanje, a takođe se zahteva i određena gustina, bistrina i pH vrednost. Bioetanol koji je namenjen za smeše sa fosilnim gorivom mora imati minimalnu čistoću od 99,5% do 99,8% vol. u zavisnosti od standarda zemlje gde se proizvodi [4]. Bioetanol se može mešati u različitim proporcijama sa motornim benzinom ili dizelom. Naime, bioetanol se lakše meša sa benzinom nego sa dizel gorivom, pa zbog toga ukoliko se želi napraviti dizehol (smeša sa više od 3% bioetanola) potrebni su specijalni emulgatori [6]. Najpoznatije smeše su [44]:

- a) Smeše sa niskim udelom bioetanola u fosilnom gorivu. Ovde spada smeša motornog benzina i bioetanola u udelu od 5 do 22% (ovo gorivo se označava kao E5-E22G). Pored toga, moguće je mešati od 10 do 15% bioetanola (uz dodatak specijalnih aditiva) sa dizel gorivom. Takvo dizel gorivo naziva se oksidizel i označava kao E10D i E15D. Sve ove smeše se mogu koristiti u konvencionalnim motorima bez modifikacija.
- b) Smeše sa visokim udelom bioetanola u fosilnom gorivu. U ovim smešama sadržaj bioetanola se kreće do 85% (E85G), ali su potrebne modifikacije motora.
- c) Bio-ETBE. Ovo gorivo se može koristiti u smešama od 10 do 15% u konvencionalnim motorima bez modifikacija.

U tabeli 1.6. prikazane su osnovne fizičke i hemijske karakteristike bioetanola i benzina radi njihovog poređenja [45, 46]. Bioetanol ima niži sadržaj energije nego mnoga tečna fosilna goriva. Energetski sadržaj bioetanola iznosi oko 67% energije motornog benzina i oko 58% energije dizel goriva. Prema tome, potrebno oko 1,47 litara čistog bioetanola za zamenu 1 litra motornog benzina, i oko 1,7 litara za zamenu 1 litra dizela. Međutim, kada se bioetanol koristi u relativno malim koncentracijama u smeši sa fosilnim gorivom ovaj efekat je višestruko smanjen. U takvim slučajevima pozitivni efekti dodatka bioetanola (kao što su efikasnije sagorevanje, bolje podmazivanje i dr.) mogu delimično kompenzovati uticaj manjeg sadržaja energije po jedinici zapremine.

Tabela 1.6. Osnovne karakteristike bioetanola i benzina [45, 46]

	Bioetanol	Benzin
Formula	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>
Molekulska težina, g/mol	46,07	100,2
Sadržaj ugljenika, wt %	52,2	83,9
Sadržaj vodonika, wt %	13,1	16,1
Sadržaj kiseonika, wt %	34,7	0
Sadržaj sumpora, ppm	0	~200
Stehiometrijski odnos vazduh/gorivo, kg/kg	9,0	14,7
Gustina (15°C), kg/l	0,789	0,737
Napon pare, kPa	16,5	75
Temperatura ključanja, °C	78,3	38-204
Latentna toplota isparavanja, MJ/kg	26,87	43,47
Temperatura (tačka) samopaljenja, °C	365	495
Oktanski broj	107	86-94
Cetanski broj	8	11

Prednosti korišćenja bioetanola kao goriva su: smanjena emisija CO i CO<sub>2</sub>, potpunije sagorevanje u odnosu na benzin zbog velikog udela kiseonika, manji sadržaj nesagorelih ugljovodonika i slični sadržaj azotnih oksida NO<sub>x</sub> [4]. Performanse vozila (snaga, ubrzanje, putna brzina) koja koriste bioetanol kao gorivo su slične kao i kod pogona na čist benzin, ali se zbog manje toplotne moći smanjuje se radijus kretanja (pređeni put sa jednim litrom goriva) za oko 28%. Rafinerije su nakon izbacivanja olova iz fosilnih goriva počele da dodaju oksigenatne aditive u cilju povećanja oktanskog broja goriva. U tu svrhu dodavani su alkoholi i etri (benzen, ksilen i toluen), a pritom su etri vrlo toksični za okolinu. Za razliku od njih, bioetanol predstavlja odličan, netoksičan dodatak kojim se može povećati oktanski broj fosilnih goriva. Takođe i ETBE se u nižim koncentracijama (do 15%) može koristiti kao oksigenator za povećanje oktanskog broja, a i kao zamena za toksičan MTBE (metil-tercijarni butiletar). Pored povećanja oktanskog broja, ova dva oksigenatna aditiva poboljšavaju i termičku efikasnost paljenja motora i smanjuju zagađenost izduvnih gasova ostvarujući bolje sagorevanje u motoru [4, 45, 46].



S druge strane, bioetanol ima i određene slabije karakteristike u odnosu na fosilna goriva. Naime, svi postojeći konvencionalni motori na fosilna goriva ne mogu se koristiti za vožnju na čist bioetanol bez značajnih modifikacija mašine motora. Otuda je uobičajeno da se projektuju višegorivna vozila koja mogu koristiti čist benzin i mešavine ovih goriva do odnosa 85% etanola i 15% benzina (E85). Smatra se da smeša motornog goriva i bioetanola (sa maksimalnim udelom do 22%) ne zahteva nikakve modifikacije konvencionalnih motora [34]. Modele vozila koja mogu koristiti gorivo E85 u svom proizvodnom programu za 2005. godinu imaju firme: Daimler-Chrysler, Ford Motor Co., General Motors-Chevrolet, Mercedes-Benz i Nissan [45]. Prilikom korišćenja čistog bioetanola može doći do rastvaranja pojedinih metala iz metalnih legura od kojih je izgrađen motor (cinka, olova, aluminijuma i dr.), a takođe i do nagrivanja gumenih delova. Osim toga, bioetanol ima niži cetanski broj, niži napon pare i nižu toplotu isparavanja od motornog benzina (tabela 1.6.), što može izazvati probleme prilikom paljenja i startovanja motora u hladnijim klimatskim predelima i povećati nastajanje acetaldehida (aldehidi značajno utiču na zagađenje životne sredine formirajući fotohemijski smog) [46]. Što se tiče distribucije i korišćenja bioetanola važno je naglasiti da je transport bioetanola ili smeša bioetanola sa fosilnim gorivom kroz postojeće transportne sisteme, pumpe i cevovode otežano zbog osobine bioetanola da absorbuje vodu i zbog njegove visoke sposobnosti da rastvara određene primese, tako da bi njegova upotreba zahtevala određenu modifikaciju postojećih pumpi za gorivo.

#### **1.4. EKOLOŠKI ZNAČAJ PRIMENE BIOETANOLA KAO GORIVA**

Ulaskom u treći milenijum svet se približio kritičnoj tački zagađenja životne sredine usled neravnomerne raspodele i trošenja raspoloživih energetske resursa, rasta svetske populacije, velikog jaza između mogućnosti i rasta potreba svetskog stanovništva, nekontrolisanog trošenja i rasipanja neobnovljivih izvora energije i nepovratnog uništenja životne sredine. Stoga je neophodno donošenje odluka ekonomske i energetske-ekološke politike čime bi se odredili načini optimizacije svih

procesa i donele određene mere i aktivnosti u cilju racionalnog korišćenja energije, smanjenja potrošnje energije i zagađenja životne sredine.

Najznačajniji ekološki problemi u svetskim razmerama su *globalno zagrevanje atmosfere* nastalo sagorevanjem fosilnih goriva i izdvajanjem ugljendioksida (efekat „staklene bašte“), *pojava kiselih kiša* i sve *veće količine sumpordioksida i azotnih oksida* u atmosferi (koji se javljaju kao izazivači klimatskih promena) [11].

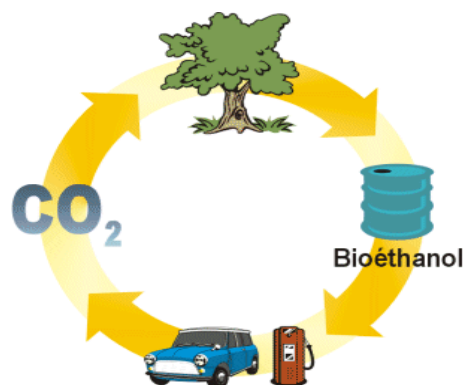
#### 1.4.1. Emisija štetnih gasova pri sagorevanju motornih goriva i bioetanola

Emisija gasova iz motornih vozila je jedan od najvećih zagađivača životne sredine. Sagorevanjem goriva u saobraćaju u atmosferu se emituju: ugljendioksid, ugljenmonoksid, oksidi azota i sumpora, ugljovodonici, olovo, neorganska jedinjenja hlora i broma, aromatična i druga jedinjenja. Veliki broj jedinjenja se razlaže do neškodljivih molekula, dok se reakcijom između oksida azota i isparljivih organskih materija stvara ozon. Neka jedinjenja se razlažu do sekundarnih zagađivača vazduha koje pored ozona čine i aldehidi. Saznanje o negativnim uticajima ovih zagađivača na životnu sredinu podstaklo je međunarodnu zajednicu na donošenje propisa kojima se određuje kvalitet tečnih naftnih goriva koji će biti prihvatljiv za životnu sredinu i zdravlje ljudi, kao i podsticanje korišćenja alternativnih goriva kojima se navedene štetne emisije znatno smanjuju.

*Ugljendioksid* je neizbežan proizvod sagorevanja goriva i jedan od najznačajnijih zagađivača koji doprinosi efektu „staklene bašte“ i globalnom zagrevanju. Nivo emisije CO<sub>2</sub> iz nekog procesa sagorevanja zavisi od efikasnosti procesa i od sastava goriva. Goriva sa većim udelom vodonika u molekulu oslobađaju manje CO<sub>2</sub>. Utvrđeno je da je transport kao privredna grana ključni generator emisije CO<sub>2</sub> i da je odgovaran za oko 28% od ukupne emisije CO<sub>2</sub> u EU [47]. Proizvođači vozila u EU ulažu napore za ispunjenje zahteva za postizanjem emisije CO<sub>2</sub> iz putničkih vozila od 140 g/km do 2008. godine, odnosno 120 g/km CO<sub>2</sub> do 2012. godine [4].

Doprinos sagorevanja nekog goriva nastanku efekta „staklene bašte“ mora se sagledati kroz celokupni životni ciklus goriva. Način sagorevanja bioetanola zavisi od vrste kulture koja se prerađuje i načina njegove proizvodnje (u razmatranje se moraju uzeti svi

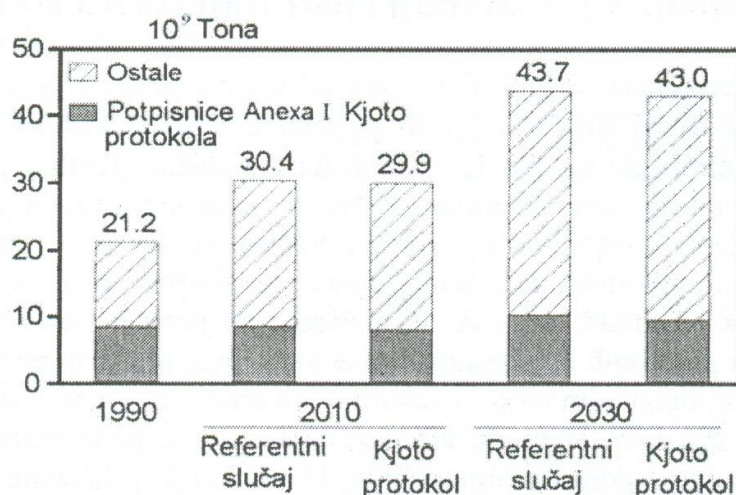
međuproceni proizvodnje etanola). Ukupan bilans emisije CO<sub>2</sub> pri sagorevanju bioetanola je jednak nuli – u procesu fotosinteze biljke potroše onu količinu CO<sub>2</sub> koja nastaje procesom sagorevanja bioetanola (slika 1.8.). Ovo je još jedan podsticajan faktor koji doprinosi stalnom povećanju upotrebe biogoriva [4].



Slika 1.8. Ukupan bilans emisije CO<sub>2</sub> u procesu sagorevanja bioetanola

Prirodni efekat „staklene bašte“ je podigao temperaturu Zemlje i načinio je pogodnom za stanovanje. Srednja vrednost sunčevog zračenja od 343 W/m<sup>2</sup> pada na zemlju, od čega se jedna trećina reflektujući vraća u kosmos. Ostatak, odnosno dve trećine, utiče na zemlju stvarajući infracrvenu radijaciju, a jedan deo se blokira u gasove „staklene bašte“ koji zagrevaju zemljinu spoljašnjost i troposferu. Neki gasovi „staklene bašte“ prirodno su prisutni u atmosferi (vodena para, ugljendioksid, metan, azotdioksid i ozon) dok su drugi rezultat ljudskih aktivnosti. Međutim, i prirodno prisutni gasovi u atmosferi premašili su sve dozvoljene granice i doveli su do ekoloških problema [11]. Kao što je već napomenuto, CO<sub>2</sub> najviše doprinosi efektu „staklene bašte“ pa samim tim je neophodno regulisati nivo njegove emisije. Naime, globalna temperatura u 2001. god. je bila 0,52 °C iznad prosečne temperature. Smatra se da će povećanje emisije ugljendioksida za 54% do kraja 2015. god. izazvati povećanje globalne temperature od 1,7 do 4,9 °C u periodu od 1990-2100. god. [48]. Na Samitu Ujedinjenih nacija u Rio de Žaneiru 1992. god. 152 države su prihvatile koncept održivog razvoja. Jedan od glavnih ciljeva je i redukcija emisije ugljendioksida i ostalih gasova „staklene bašte“.

Podaci o emisiji ugljendioksida iz 1990. god., kao i predviđene emisije za 2010. i 2030. godinu prikazani su na slici 1.9. [4].



Slika 1.9. Svetska emisija ugljendioksida u 1990. god. i predviđene emisije u 2010. i 2030. god. za dva slučaja - referentni slučaj i slučaj Kjoto protokola [4]

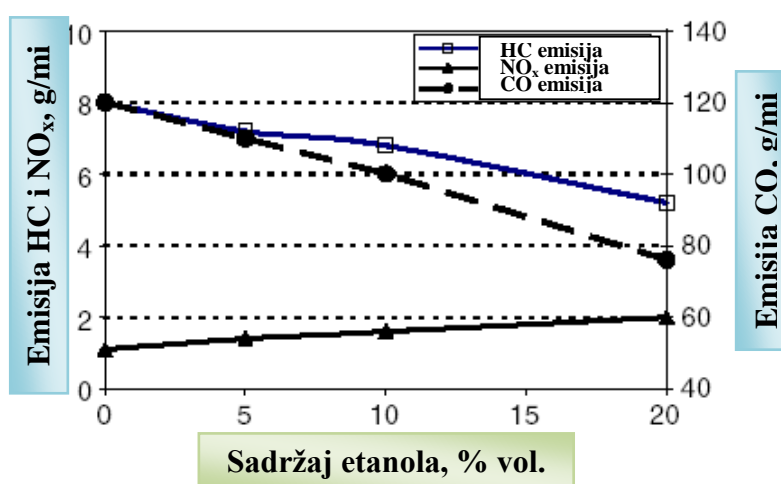
Kao što se može videti sa slike 1.9., očekuje se značajan porast emisije ugljendioksida u ovom periodu, a povećanje će se uglavnom generisati u zemljama u razvoju. Zemlje potpisnice Aneksa I Kjoto protokola značajno će redukovati svoje emisije ugljendioksida. Takođe se procenjuje da će oko 90% od ukupnog projektovanog povećanja emisije CO<sub>2</sub> u periodu od 1990. do 2010. godine poticati od sektora transporta [36].

Prednost korišćenja mešavine bioetanola i motornog benzina je u smanjenju emisije određenih štetnih gasova. Međutim, s druge strane može doći i do povećanja emisije određenih zagađivača ili do nepromenjenog stanja u emisiji u zavisnosti od sastava goriva. Naime, korišćenjem etanola kao goriva ili kao dodatka benzinu dolazi do smanjenja **ugljenmonoksida**. Istraživanja su pokazala da je korišćenjem bioetanola kao goriva moguće smanjiti emisiju CO čak i do 30% u zavisnosti od tipa i starosti vozila, korišćenog sistema kontrole nivoa zagađenja i atmosferskih uslova. Ukoliko se koristi gorivo E10 dolazi do smanjenja emisije za oko 25%, usled potpunijeg sagorevanja zbog prisustva kiseonika u gorivu (slika 1.10.) [46].

Ukoliko udeo bioetanola u smeši sa benzinom raste od 0 do 20% vol. dolazi i do smanjivanja emisije **ugljovodonika**, kao što je prikazano na slici 1.10. [46]. Zbog visokog oktanskog broja, dodavanje etanola motornom benzinu dovodi do redukcije ili uklanjanja aromatičnih ugljovodonika (kao što je benzen) i ostalih toksičnih visoko-oktanskih aditiva koji se koriste za zamenu olova u benzinu. S obzirom da se dodatkom

etanola motornom benzinu značajno smanjuje emisija ugljovodonika i ugljenmonoksida time se i smanjuje stvaranje ozona. Međutim, pri velikim udelima bioetanola u smeši sa benzinom zapaža se povećanje emisije ugljovodonika i smanjenje emisije oksida azota [46].

Korišćenjem smeša bioetanola i motornog benzina raste emisija *oksida azota*  $\text{NO}_x$  kao što je prikazano na slici 1.10. Zbog toga je regulisanjem količine bioetanola dodatog benzinu važno obezbediti što manju emisiju azotnih oksida, ne samo zbog njihove direktne toksičnosti, već i zbog smanjenja nastajanja ozona koji je u većim koncentracijama izuzetno toksičan (nadražuje disajne organe i može dovesti do plućnog edema i smrti) [49].



Slika 1.10. Promene u emisiji HC,  $\text{NO}_x$  i CO pri sagorevanju smeša motornog benzina i različitog udela bioetanola [46]

Dodavanjem manje količine bioetanola (2-5% vol.) u mešavini sa motornim benzinom povećava se isparljivost benzina i dolazi do značajnog povećanja emisije *isparljivih organskih materija*, dok se dodavanjem većih količina bioetanola (>10% vol.) značajno ne utiče na povećanje emisije ovog zagađivača. Fotohemijski (beli) smog nastaje kada primarni zagađivači nastali sagorevanjem fosilnih goriva (azotni oksidi i isparljiva organska jedinjenja-hidrokarbonati) reaguju pod dejstvom sunčeve svetlosti, i stvaraju smešu raznovrsnih opasnih hemijskih jedinjenja poznatih kao sekundarni zagađivači [50].

Jedan od većih problema pri sagorevanju etanola je emisija *aldehida* (posebno acetaldehida) koja je dva do četiri puta veća nego pri sagorevanju benzina. Sa povećanjem

udela bioetanola raste emisija acetaldehida. Dozvoljene količine aldehida u vazduhu nisu regulisane zakonom [4].

Prilikom sagorevanja smeša bioetanola i benzina dolazi do emisije i ostalih toksičnih jedinjenja kao što su: formaldehid, propionaldehid, akrolein, benzen, etilbenzen, 1-3 butadien, heksan, toluen, ksilen i fine čestice. Korišćenjem smeša bioetanola i motornog benzina emisija benzena se može redukovati i do 50%, a emisija 1-3 butadiena od 24 do 82% [46].

Kao proizvod nepotpunog sagorevanja goriva javljaju se i **čestice**, veoma malih dimenzija, čija se emisija može smanjiti poboljšanjem kvaliteta goriva i procesa sagorevanja, naknadnim tretmanom izduvnih gasova itd. Prema karakteru čestice se mogu podeliti na organski nerastvorljive (čad, čestice metala nastale u procesu habanja delova i pepeo iz goriva) sa udelom oko 61% i organski rastvorljive sa udelom oko 39% [49].

U tabeli 1.7. prikazan je uticaj dodatka bioetanola motornom benzinu u količini od 10% vol. na promenu emisija pojedinih zagađivača [51].

Tabela 1.7. Prosečne vrednosti emisija određenih zagađivača pri vožnji 80.000 km u klasičnom putničkom vozilu [51]

Zagađivač	Emisija, g/km	
	Benzin	E10
CO <sub>2</sub>	230	214
CO	0,4688	0,2279
HCHO	0,0007	0,0006
Nemetanski organski gasovi	0,0273	0,0273
NO <sub>x</sub>	0,0621	0,0932
SO <sub>x</sub>	0,0488	0,0455

Suočeni sa sve većim zagađenjem životne sredine, kao posledice porasta broja motornih vozila, u Evropi su već sedamdesetih godina XX veka donešene zakonske odredbe o emisiji gasova pri sagorevanju goriva (trenutno je na snazi Pravilnik ECE 83). Prema propisima kontrolišu se sledeći toksični parametri: ugljenmonoksid, azotni oksidi (NO, NO<sub>2</sub> i N<sub>2</sub>O), ozon, sumpordioksid, čestice, ugljovodonici i olovo [49]. Evropska

Unija nastavlja sa daljim poboljšanjem postojećih i uvođenjem novih propisa o zagađenju i energiji. Oni se baziraju na sve strožijim zahtevima u pogledu dozvoljenog nivoa kvaliteta emisije i potrošnje goriva, uz uvođenje savršenije i skuplje merne opreme.

#### 1.4.2. Održivi razvoj u funkciji zaštite životne sredine

*„Najveći izazov ovog novog veka je prihvatiti ideju koja izgleda apstraktno – održivi razvoj – i pretvoriti je u stvarnost za sve ljude sveta“*  
*Kofi Anan, Generalni sekretar Ujedinjenih Nacija,*  
*Mart, 2001.[52]*

Porast proizvodnje biogoriva rezultat je svesti o neophodnosti poštovanja koncepta održivog razvoja. **Održivi razvoj („sustainable development“)** je sistem tehničko-tehnoloških, ekonomskih i društvenih mera za promišljeno korišćenje prirodnih neobnovljivih i obnovljivih resursa, ekonomski razvoj i zaštitu životne sredine. Postoji više desetina definicija održivog razvoja među kojima je najprihvaćenija ona koju je dala Svetska komisija za životnu sredinu i razvoj pod vođstvom gospođe Gro Harlem Brundtland 1987.godine: "Održivi razvoj je razvoj koji odgovara potrebama i aspiracijama sadašnje generacije bez ugrožavanja mogućnosti zadovoljenja potreba i aspiracija budućih generacija" [53]. Održivi razvoj, kao model opšteg socijalnog razvoja, prihvaćen je 1992. godine u Rio de Žaneiru na Konferenciji Ujedinjenih nacija, a prethodno je definisan, kao što je već napomenuto, u tzv. Brundtland izveštaju 1987. godine. Sedamnaest godina posle zvanične promocije i prihvatanja modela održivog razvoja čovečanstvo i dalje živi u uslovima bespoštednog naučno-tehničkog iskorišćavanja svih raspoloživih sirovina, zato se ovaj koncept održivog razvoja mora prihvatiti kao generalno usmerenje i težnja čoveka da stvori drugačiji i bolji svet, balansirajući ekonomski, socijalni, kulturni i razvoj životne sredine. Počev od Konferencije Ujedinjenih nacija sve do Samita u Johaneshburgu 2002. god. koncept održivog razvoja se postepeno razvijao dobijajući vremenom nove dimenzije, a jedna od njih je i primena obnovljivih izvora energije [52, 54]. Uključivanje obnovljivih izvora energije je prioritet u razvoju koncepta održivog razvoja u celom svetu.

## 2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA

Bioetanol se može proizvesti fermentacijom iz svih sirovina koje sadrže šećere (ili polisaharide koji se mogu razgraditi do šećera) koje kvasac može da previre. Šećeri koje kvasac može previrati su glukoza, fruktoza, saharoza i maltoza, a primenom specijalnih kvasaca i galaktoza i laktoza. Polisaharidi koji se mogu razgraditi do ovih fermentabilnih šećera (hemijski ili enzimski) su dekstrini, skrob, inulin, hemiceluloze i celuloze [55, 56].

Sirovine za proizvodnju etanola mogu se grupisati na sledeći način:

1. **Šećerne sirovine** (šećerna repa, šećerna trska, voće)
2. **Lignocelulozne sirovine** (otpadna biljna masa)
3. **Sporedni ili nus proizvodi određenih industrija** (melasa, sulfitni lug, surutka, hidrol i dr.)
4. **Skrobne sirovine** (krtolaste sirovine - krompir, sladak krompir i kasava; i žitarice - kukuruz, pšenica, ječam, raž, sirak, tritikale).

Kada se razmatra mogućnost industrijske proizvodnje bioetanol na određenim sirovinama moraju se uzeti u razmatranje faktori kao što su koncentracija ugljenih hidrata (tj. količina etanola koja se može dobiti iz jedinice težine sirovine), zatim cena i dostupnost sirovine, kao i cena tehnološkog postupka za proizvodnju etanola na određenoj sirovini [34]. Cena i dostupnost različitih sirovina se razlikuje u različitim delovima sveta, pa samim tim svaka zemlja se opredeljuje za korišćenje onih sirovina kojih ima najviše u njenom geografskom i klimatskom području. Na primer, u Severnoj Americi i Evropi industrijska proizvodnja etanola je zasnovana na skrobnim sirovinama u skladu sa agrokološkim uslovima. U Brazilu, kao jednom od najvećih proizvođača etanola u svetu, najzastupljenija sirovina je šećerna trska. Značajna karakteristika svake sirovine je i prinos po jedinici obradive površine što znatno varira od klime, osobina zemljišta i primenjenih agrotehničkih mera. Pored toga, bitni su i dužina vegetacionog perioda određenih kultura, zahtevi za gajenje na zemljištu određenog kvaliteta, mogućnost skladištenja (kako bi se omogućio kontinualan rad industrijske proizvodnje) itd. [4]. Kako bi se izvršilo poređenje



najvažnijih predstavnika šećernih, škrobnih i lignoceluloznih sirovina i razmotrile njihove prednosti i mane, u tabeli 2.1. su prikazani njihovi osnovni parametri [4, 18, 24].

Tabela 2.1. Osnovni parametri pojedinih šećernih, škrobnih i lignoceluloznih sirovina za proizvodnju etanola kao goriva [4, 18, 24]

Sirovina	Prinos, t/ha	Specifično iskorišćenje etanola na sirovinu, l/t	Godišnje iskorišćenje etanola na površinu, l/ha·god	Odnos output/input	Cena sirovine, US\$/kg	Cena proizvodnje anhidrovanog etanola US\$/l
Šećerna trska (Brazil)	70-122,9	68-70	5.345-9.381	2,5-10,2	0,0100	0,1980
Šećerna repa	66-78	80-100	5.000-6.600	1,9	0,170	0,4910
Kukuruz (SAD)	6-10	350-460,6	6.600	1,34-1,53	0,076	0,2325
Pšenica	1,5-3,0	340-370	1.020-3.214	2,24-2,84	0,188	0,402
Krompir	17-20	100	1.700-2.000	-	0,020	1,330
Sirak	1-6	340	340-2.040	-	0,149	0,386
Sirak šećerac	25-35	68-86	1.700-9.030	-	-	-
Kasava	20	180	3600	-	-	-
Slama	1,93-3,86	170-261	-	-	-	0,651

Ukoliko se uporedi energetska sadržaj (odnos energije output-a i input-a) šećerne trske i kukuruza (tabela 2.1.) može se videti da šećerna trska ima značajnu prednost. Međutim, i ostali parametri se moraju uzeti u obzir. Naime, specifično iskorišćenje etanola na sirovinu (tj. količina etanola koja se može dobiti iz jedinice težine sirovine) je oko pet puta veće kod kukuruza nego kod šećerne trske, s obzirom na veću količinu fermentabilnih šećera koji se mogu osloboditi iz škrobne sirovine tj. kukuruza. S druge strane, godišnje iskorišćenje etanola po jedinici obradive površine (izraženo u jedinicama l/ha·god) na kojoj se uzgaja kukuruz je manje nego u slučaju šećerne trske, što zahteva i zasejavanje većih obradivih površina sa kukuruzom. Šećerna repa ima znatno manje specifično iskorišćenje etanola na sirovinu u odnosu na kukuruz, ali pošto je prinos etanola po jedinici površine mnogo veći nego kod kukuruza onda je i godišnje iskorišćenje etanola na površinu veće.

Ako se razmatraju ukupni troškovi proizvodnje etanola (primenom postojećih komercijalnih tehnologija) više od 40% čine troškovi sirovine. Korišćenjem šećernih sirovina, kao što je šećerna trska, mogu se znatno umanjiti troškovi proizvodnje s obzirom na nisku cenu šećerne trske u odnosu na skrobne sirovine (tabela 2.1.).

## 2.1. ŠEĆERNE SIROVINE

Najznačajnije šećerne sirovine za proizvodnju bioetanola su: šećerna repa, šećerna trska i topinambur.

Šećerna repa i šećerna trska se tradicionalno koriste za proizvodnju šećera. Inače, zbog visokog sadržaja saharoze one predstavljaju sirovine koje su pogodne za proizvodnju bioetanola. **Šećerna repa** je vrlo rasprostranjena biljka i prilagodljiva različitim klimatskim i zemljišnjim uslovima. Najznačajniji deo biljke je koren u kome je i sadržan najveći deo šećera saharoze. Sadržaj saharoze u šećernoj repi je od 12 do 25% u zavisnosti od sorte, sastava zemljišta, uslova vegetacije i dr. Korišćenje šećerne repe za proizvodnju bioetanola zavisi od njene trenutne cene i podobnosti za rast na određenim podnebljima i klimatskim uslovima [4]. Cena proizvedenog etanola na šećernoj repi je još uvek nekonkurentna ceni bioetanola proizvedenog na šećernoj trsci ili kukuruzu (tabela 2.1.).

**Šećerna trska** raste u tropskim krajevima sveta, i najznačajnija je sirovina za proizvodnju bioetanola u Brazilu. Kao i kod šećerne repe osnovni sastojak je saharoza (70-91%), a pored ovog šećera sadrži i glukozu (2-4%) i fruktozu (2-4%) [4].

**Topinambur** (Jerusalimska artičoka) vodi poreklo iz Severne Amerike, a u XVII veku je prenet u Evropu. Prednosti ove biljke su njena visoka produktivnost i relativno visok sadržaj ugljenih hidrata (uglavnom inulina) u njenoj krtoli. Inulin je polisaharid koji se sastoji od ostataka fruktoze, i za razliku od skroba lakše se razgrađuje do šećera koje kvasac može da previre [4]. Topinambur ima puno dobrih osobina koje je čine pogodnom za proizvodnju bioetanola, a to su pre svega rezistencija na biljne štetočine i na niske temperature, mali zahtevi u toku kultivacije i mogućnost gajenja na siromašnom tzv. marginalnom zemljištu [55]. U Vojvodini su vršena ispitivanja korišćenja topinambura kao sirovine za proizvodnju etanola (na tri lokaliteta: Bački Petrovac, Vladimirovac i Jasenovo)

i poređenjem sa ostalim korišćenim škrobnim i šećernim sirovinama ostvareni su veoma visoki prinosi. Međutim, topinambur se neće gajiti na plodnom zemljištu u našoj zemlji i pored ostvarenih visokih prinosa, jer takva zemljišta treba da služe za gajenje osnovnih ratarskih kultura. Zbog toga je topinambur veoma zahvalna sirovina koja uspeva i na neplodnom, peskovitom zemljištu [57, 58].

## 2.2. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

**Lignocelulozna biomasa** uključuje biljnu i drvenu biomasu, otpadnu poljoprivrednu biomasu, otpatke iz proizvodnje papira i dr. Pod opštim nazivom lignocelulozna biomasa podrazumeva se kompleksna biomasa koja sadrži celulozu (~45% na suhu materiju), hemicelulozu (~30% na suhu materiju) i lignin (~25% na suhu materiju). Celuloza predstavlja polimer glukoze koja je povezana  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama. Stepenn polimerizacije celuloze zavisi od sirovine i prosečno iznosi od 2.000 do 27.000 glukoznih jedinica [59]. Hemiceluloze predstavljaju ugljenohidratne polimere koji pored heksoza sadrže i pentoze (stepenn polimerizacije je oko 200). Hemiceluloze mogu hidrolizovati do sledećih monomernih komponenata: glukoza, manoza, galaktoza, ksiloza, arabinoza i manjih količina ramnoze, glukouronske, metilglukouronske i galaktouronske kiseline [4]. Lignin koji je prateći sastojak lignocelulozne biomase je nerazgradljiv sastojak i ne može se fermentisati do etanola, pa samim tim ometa efikasnu hidrolizu do glukoze [60]. Lignin je veoma kompleksan molekul sastavljen iz fenilpropanskih jedinica. Hemijske veze između celuloze, hemiceluloze i lignina su estarske, etarske i glikozidne. Etarske veze su stabilnije od estarskih veza između lignina i ugljenih hidrata [4].

Lignocelulozne sirovine se mogu podeliti u šest grupa [18]:

- otpadna poljoprivredna biomasa (ostaci nakon žetve kukuruza, šećerne trske i sirka, slama, ostaci pirinča, pulpa i koštice maslina i sl.)
- tvrdo drvo (jasika, topola i sl.)
- meko drvo (bor, omorika i sl.)
- celulozni otpaci (novine, stara hartija, karton i sl.)
- biomasa različitih trava (lucerna i sl.)

- komunalni čvrsti otpad

Ova biomasa predstavlja najveću i svima dostupnu sirovinsku bazu. Smatra se da lignocelulozna biomasa čini oko 50% ukupne svetske biomase i njena godišnja proizvodnja se procenjuje na oko 10-50 milijardi tona [61]. Pretpostavlja se da će u bliskoj budućnosti biti najzastupljenija i najperspektivnija u industrijskoj proizvodnji bioetanola (druga generacija biogoriva). Lignocelulozne sirovine se i danas koriste, u nekim zemljama (Severna Evropa, Kanada, USA), mada u manjem obimu. Na današnjem nivou razvoja tehnologije, konverzije ovih sirovina do fermentabilnih šećera su niske i procesi su ekonomski nepovoljni, ali se zbog niske cene i velike dostupnosti polazne sirovine danas veoma ulaže u razvoj i unapređenje ovih tehnologija. Jedna od značajnih prednosti korišćenja ove sirovine je i što nije u direktnoj vezi sa proizvodnjom hrane, kao što su to razne žitarice i skrobne sirovine. Međutim, najveći problem je priprema za fermentaciju zbog kompleksnosti hemijske strukture lignocelulozne biomase. Da bi se navedeni polimeri razložili neophodan je prethodni predtretman kako bi se omogućila dalja razgradnja polimera do prostih jedinica. Razrada ovog postupka bi omogućila neograničenu proizvodnju etanola [4]. Predtretman se može vršiti fizičkim putem (mlevenje, sitnjenje, piroliza), fizičko-hemijskim putem (ozonoliza, hidroliza kiselinama ili bazama na visokim temperaturama, oksidativna delignifikacija i vlažna oksidacija) ili biološkim putem (predtretman glijvama koje razlažu lignin) [18].

U svetu su vršena ispitivanja primene različitih interesantnih lignoceluloznih materijala, kao što su slama pirinča [62], ostaci stabljika i lišća kukuruza [63, 64], papir [65], mahula cveće (*Madhuca latifolia* L.) [66], topola, eukaliptus i slama [67], trava lucerna [68], zelena salata i zumbul [69], stabljike suncokreta [70] i dr. Međutim, proizvodnja etanola iz lignoceluloznih materijala je ispod nivoa ekonomičnosti koja se postiže na skrobnim sirovinama. U budućnosti (do kraja 2015. god.) se očekuje da cena etanola dobijenog iz lignoceluloznih sirovina bude najniža u odnosu na primenu drugih sirovina (0,140 US\$/l) [4].

### 2.3. NUS PROIZVODI RAZNIH TEHNOLOGIJA

Prednosti korišćenja ovih sirovina u proizvodnji bioetanola su niske cene i pozitivan ekološki efekat (smanjenje zagađenosti). Međutim, nedostaci su niska koncentracija šećera koja je nedovoljna za ekonomično dobijanje bioetanola, neophodnost dodavanja nutrijenata i konkurencija sa uspostavljenim tržištima stočne hrane i nusproizvoda [4]. Nusproizvodi koji se koriste za proizvodnju bioetanola su: melasa šećerne repe i šećerne trske, otpadne vode iz industrije skroba, otpadni sulfitni rastvori i surutka.

**Melasa** se dobija kao sporedni proizvod pri proizvodnji šećera iz šećerne repe ili šećerne trske (predstavlja sirup koji nastaje pri poslednjem stepenu kristalizacije u postupku prerade šećernih sirovina). Melasa predstavlja gustu, viskoznu tečnost, karakterističnog mirisa sa minimalnim sadržajem suve materije 75% i sadržajem saharoze iznad 46%. Specifično iskorišćenje etanola na sirovinu je slično i kod melase šećerne repe i melase šećerne trske i u opsegu je od 250 do 330 l/t [4]. Melasa je sirovina koja se tradicionalno i dugo koristila za proizvodnju alkohola, međutim danas ona ima relativno visoku cenu i na raspolaganju su ograničene količine koje su uslovljene proizvodnjom šećera. Takođe, za melasu, kao kompleksnu sirovinu sve više konkuriše i savremena biotehnološka proizvodnja organskih kiselina, aminokiselina, rastvarača, vitamina, antibiotika i proizvodnja pekarskog kvasca. Rešavanje problema visoko zagađenih otpadnih voda i drugih ekoloških problema koji se javljaju pri proizvodnji etanola iz melase zahteva značajna ulaganja, što smanjuje rentabilnost takve proizvodnje. Problem je takođe i tendencija pada proizvodnje šećerne repe kod nas i u svetu, tako da je usmeravanje proizvodnje etanola ka ovoj sirovini neizvesno [71]. Melasa je prema postojećim procenama u Srbiji deficitarna sirovina i morala bi se uvoziti u cilju veće proizvodnje bioetanola.

**Sulfitni lug** je sporedni proizvod sulfitnog postupka prerade drveta. Njegov sastav zavisi od vrste drveta. Sulfitni lug četinarara je pogodniji za proizvodnju bioetanola, jer sadrži heksoze, za razliku od sulfitnog luga listopadnog drveća koji sadrži pentoze i

pogodniji je za proizvodnju biomase [72]. Vrednost specifičnog iskorišćenja etanola na sirovinu je veoma niska i iznosi oko 1 l/t [4].

**Surutka** predstavlja tečnu frakciju koja zaostaje taloženjem kazeina pri proizvodnji sira. Razlikuje se surutka (kiselinsko taloženje) i mlečni serum (enzimsko taloženje). Sadrži 70-80 % na suhu materiju laktoze u kojoj je prisutna  $\beta$  - galaktozidna veza između glukoze i galaktoze koju mogu da raskinu kvasci: *Candida pseudotropicalis*, *Candida kefyr*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces fragilis* [72]. Dobar je izvor biotika, a specifično iskorišćenje etanola na sirovinu iznosi 20 l/t [4].

**Hidrol** (žitna melasa) zaostaje nakon proizvodnje kristalne glukoze iz skroba. Hidrol je sa stanovišta mikroorganizama siromašan u hranljivim sastojcima. Sadrži gotovo 77% šećera u suvoj masi, minimalne količine vitamina i faktora rasta, a ne sadrži izvore azota. Ostatak čine različiti oligosaharidi nastali reverzijom, koje kvasci ne mogu da koriste. Zbog toga se hidrol podvrgava enzimskoj hidrolizi [72].

## 2.4. SKROBNE SIROVINE

U proizvodnji etanola koriste se sledeće skrobne sirovine: a) krtolaste sirovine (krompir, sladak krompir i kasava) i b) žitarice (kukuruz, pšenica, ječam, raž, sirak i tritikale).

**Krompir** je kao sirovina za proizvodnju bioetanola pod znakom pitanja zbog relativno visoke cene i sezonskog rada postrojenja. Upotreba krompira za dobijanje etanola je opravdana u slučaju postojanja značajnih količina otpadnog materijala pri preradi krompira, kao i u oblastima sa velikim tržišnim viškovima krompira [73]. Najviše se koristi u proizvodnji etanola u Nemačkoj i Istočnoj Evropi. Krompir pored skroba (12-21%) sadrži i manje količine šećera (saharoze, glukoze i fruktoze) [4].

**Kasava** (tapioka ili manioka) je tropska biljka koja ima krtolu sa značajnim sadržajem skroba od 80-89% i sadržajem ukupnih šećera od 3,6-6,2% [4]. Glavne oblasti proizvodnje su Istočna i Zapadna Afrika, Brazil, Indija, Indonezija, Madagaskar, Malezija, Tajland i Filipini. Pošto je ova biljka nestabilna (ne može se dugo skladištiti) preporučuje se korišćenje odmah nakon žetve, ili se suši i melje radi dobijanja suvog skrobnog brašna.

Pošto manioka sadrži toksične količine cijanogenih glukozida, potrebno je pre proizvodnje bioetanola prethodno izvršiti njenu detoksifikaciju (aeracijom). Prednosti kasave kao sirovine za proizvodnju etanola su: visok prinos etanola po hektaru zemljišta, nizak kvalitet zemljišta potreban za uzgajanje i visoka otpornost na sušu i bolesti [55].

Korišćenje žitarica, koje se tradicionalno koriste u ishrani, za proizvodnju etanola može se opravdati postizanjem značajno niže cene proizvodnog postupka razgradnje skroba i prevođenja u fermentabilne šećere. Kukuruz i pšenica zbog visokih i stabilnih prinosa, ekonomične proizvodnje, viškova na svetskom tržištu (posebno SAD, Brazil i EU) i relativno stabilne cene, postaju najznačajnije skrobne sirovine za proizvodnju etanola. Savremene tehnologije omogućavaju da se žitarice do kraja iskoriste, tako da se pored visokih prinosa etanola, proizvode i stočna hraniva koja su po vrednosti identična vrednosti sirovine, generiše se energija koja se koristi u pogonu, a dobija se i CO<sub>2</sub> koji se koristi u prehrambenoj industriji. **Pšenica** sadrži oko 60% skroba i 11,7% sirovih proteina. Ukoliko sadrži više od 13% sirovih proteina javljaju se problemi u vidu stvaranja pene prilikom fermentacije. Veoma se često koristi kao sirovina za proizvodnju etanola u Nemačkoj [4]. U našoj zemlji je vršeno ispitivanje moguće upotrebe domaće sorte pšenice *Kantata* kao sirovine za proizvodnju etanola. Ova sorta nije bila pogodna za korišćenje u pekarskoj industriji pa je usmerena u proizvodnju etanola [74].

Srbija ima razvijenu poljoprivrednu proizvodnju i proizvedene količine žitarica potpuno zadovoljavaju i prevazilaze domaće potrebe za ljudskom i stočnom hranom. U stručnim krugovima se procenjuje da su tržišni viškovi žitarica oko 1.000.000 tona [75]. Da bi se proizvelo oko 100.000 tona bioetanola, koliko je procenjeno da je potrebno da bi se u našoj zemlji obezbedio dodatak bioetanola od 10% u goriva, bilo bi potrebno oko 330.000 tona žitarica. Ovo predstavlja oko 33% tržišnih viškova žitarica ili svega oko 2-4% ukupne proizvodnje žitarica (zavisno od godišnje proizvodnje žitarica). Od žitarica se u našoj zemlji najviše proizvode kukuruz i pšenica čija je proizvodnja u 2008. godini bila 6,54 i 2,12 miliona tona, respektivno [76].

**Ječam i raž** su sirovine kojima je obično posvećeno mnogo manje obradive površine od drugih žitarica. Oni daju manji prinos po zasejanoj površini i obično se koriste za proizvodnju alkoholnih pića, a njihovo korišćenje za proizvodnju bioetanola kao biogoriva se može opravdati samo u slučaju oštećenih zrnelja. Prosečan sadržaj skroba u ječmu iznosi 63%. Nedostatak ječma kao sirovine u proizvodnji etanola je visok sadržaj

glukana koji povećavaju viskozitet podloge pa neophodno posebno tretiranje za pripremu podloge [4].

**Tritikale** je hibrid pšenice i raži. Za razliku od ostalih žitarica može da razgradi sopstveni skrob, jer ima relativno visoku sopstvenu autoamilolitičku aktivnost. Neke vrste imaju i proteolitičku aktivnost. Prednosti korišćenja ove žitarice su što dobro podnosi niske temperature, otporan je na biljne bolesti, može se uspešno kultivisati u ekstenzivnim uslovima i na marginalnom zemljištu, i po prinosu ne zaostaje za hlebnim sortama pšenice. Proces proizvodnje etanola iz tritikalea je znatno jeftiniji od procesa u kome se kao sirovine koriste pšenica ili raž [4]. U našoj zemlji su vršena ispitivanja devet sorti tritikalea koji se pokazao kao perspektivna sirovina. Zbog razvijenog autoamilolitičkog enzimskog sistema proizvodnja etanola je uspešno izvedena fermentacijom sa *Saccharomyces diastaticus* bez prethodne saharifikacije [77].

**Sirak** obuhvata veći broj kulturnih i divljih biljaka. Kulturni sirkovi se gaje na svim kontinentima – najveći proizvođači su Indija, Kina i SAD, mada se može gajiti i kod nas (naša zemlja spada među poslednje u Evropi) [78]. Osobine koje ga čine pogodnim za proizvodnju bioetanola su dobra adaptivnost na različite poljoprivredne regione sveta, otpornost na sušu i mali zahtevi za đubrenjem i za ulaganjem u agrotehniku. Ova biljka sadrži i šećer i skrob. Sadržaj skroba u sirku od oko 74% je sličan kao kod kukuruza, a znatno viši od sadržaja skroba u pšenici. Sirak ima relativno visoku vrednost specifičnog iskorišćenja etanola na sirovinu od 340 l/t (tabela 2.1.), slično kao kod kukuruza, međutim prinos etanola po hektaru obradive površine je veoma nizak (1-6 t/ha). Sirak za zrno je najvažnija žitarica u tropskoj Africi, ali se gaji i u Arabiji, Indiji i južnim delovima Evrope. Sirak za zrno sadrži oko 62-65% skroba, a njegovom konverzijom do fermentabilnih šećera i fermentacijom se može ostvariti prinos etanola sličan kao kod kukuruza [55].

**Batata** je veoma slična krompiru, ali ima znatno veće krtole. Gaji se u tropskim oblastima i predstavlja važnu životnu namirnicu. Prosečni prinos po hektaru za batatu iznosi 10-15 t/ha, a specifično iskorišćenje etanola na sirovinu oko 130 l/t [4].

U našoj zemlji kao sirovine za proizvodnju bioetanola za gorivo sagledavaju se prvenstveno skrobne sirovine (kukuruz, viškovi pšenice i krompir), a zatim i namenski proizvedene sirovine uzgojem na marginalnom zemljištu (hibridni sirak, topinambur i tritikale). Da bi se ostvarila ekonomična proizvodnja etanola iz ratarskih kultura, nužan



preduslov je kompletno iskorišće nje sporednih proizvoda, u prvom redu džibre, sa osnovnom njenom primenom za stočnu hranu.

### 2.4.1. Kukuruz kao sirovina za proizvodnju bioetanola

Kukuruz (botaničko ime *Zea mays*) je jednogodišnja biljka iz porodice *Poaceae* koja daje zrnast plod, žute ili bele boje, prosečne visine oko 2,5 m (mada neke sorte mogu biti i visine oko 6m). Potiče iz Srednje Amerike, a u Evropu je prenet krajem XV i početkom XVI veka. Kukuruzno zrno građeno je iz četiri osnovna dela: korena zrna, košuljice, klice, brašnog i rožnatog endosperma, što je prikazano na slici 2.1. [71, 79].



Slika 2.1. Građa kukuruznog zrna [71, 79]

Hemijski sastav kukuruznog zrna može biti veoma različit i zavisi od sorte kukuruza, klimatskih uslova, primenjenih agrotehničkih mera, sastava zemljišta itd. U tabeli 2.2. prikazane su srednje vrednosti sastava sušenog i skladištenog zrna kukuruza [4].

Tabela 2.2. Prosečan hemijski sastav sušenog i skladištenog kukuruza [4]

Komponenta	Sadržaj, %
Voda	15,1
Skrob	62,6
Sirovi proteini	8,4
Sirova vlakna	2,0
Masti	3,7
Pepeo	1,5

Uzimajući u obzir tri osnovne sorte kukuruza, brašnaste sorte su bogatije skrobom i mastima od staklastih koji imaju više proteina. Zuban kukuruz je u sredini po sadržaju skroba, ali ima manje masti od druge dve sorte kukuruza. U kukuruznom zrnu se nalaze tri osnovne vrste proteina: zein (4,21%), globulin (1,99%) i glutelin (3,25%), koji svojim osobinama i ponašanjem pri preradi utiču na kvalitet skroba i tehnološki tretman. Zrno sadrži sledeće minerale: Ca, P, K, Fe, Mg, Na, Cl, S; i vitamine: karotin, vitamin A, tiamin, niacin, riboflavin, pantotensku kiselinu, vitamin E [71].

Prosečni hemijski sastav osnovnih delova zrna staklastog kukuruza (izražen u % na suhu materiju) prikazan je u tabeli 2.3. [71, 79].

Tabela 2.3. Raspored hranljivih materija po osnovnim komponentama zrna kukuruza [79]

Sastavni deo	Endosperm	Klica	Košuljica
Skrob	98,0	1,4	0,6
Proteini	74,8	22,4	2,8
Masti	14,5	83,7	1,8
Rastvorni ugljeni hidrati	28,1	70,2	1,7
Celuloza, hemiceluloza lignin	27,0	21,9	51,1
Soli	16,5	79,7	3,8

Kao što varira hemijski sastav zrna u celini, tako varira i hemijski sastav glavnih delova zrna – endosperma, klice i košuljice, što se može videti iz tabele 2.3. Glavni deo skroba i proteina nalazi se u endospermu zrna, dok su masti, šećeri i soli pretežno koncentrisani u klici. U košuljici se nalazi pretežan deo celuloza, hemiceluloza i lignina.

Kukuruz zbog visokih i stabilnih prinosa, ekonomične proizvodnje, viškova na svetskom tržištu i relativno stabilne cene, predstavlja jednu od najčešće korišćenih skrobnih sirovina za proizvodnju etanola. Najveća proizvodnja kukuruza je u SAD-u (42%), zatim u Aziji (26%), Evropi (12%) i Južnoj Americi (9%). U svetu se prosečno proizvodi 520 Mt kukuruza godišnje [80]. Kukuruz predstavlja osnovnu sirovinu za proizvodnju bioetanola u SAD [19].

U Srbiji je proizvodnja kukuruza u 2008. godini iznosila 6,54 miliona tona, dok su domaće potrebe od 4-4,5 miliona tona [76]. Prema tome, u našoj zemlji postoji mogućnost proizvodnje znatnih viškova kukuruza pa je ovo značajna potencijalna sirovina za proizvodnju bioetanola, što bi oslobodilo našu zemlju uvoza od oko 2,5 miliona tona nafte [71, 81]. Takođe, u našoj zemlji klimatski uslovi pogoduju gajenju kukuruza, pa ova kultura ima značajan udeo u setvi žitarica. U Srbiji je oko 67% ukupne obradive zemlje zasejano žitaricama, od čega je 1,28 miliona hektara zasejano kukuruzom a svega 488 hiljada hektara pšenicom u 2008. god. [76]. U poređenju sa drugim žitaricama i godišnjom proizvodnjom drugih poljoprivrednih kultura koje predstavljaju potencijalnu biomasu za proizvodnju etanola kukuruz predstavlja najviše zastupljenu sirovinu.

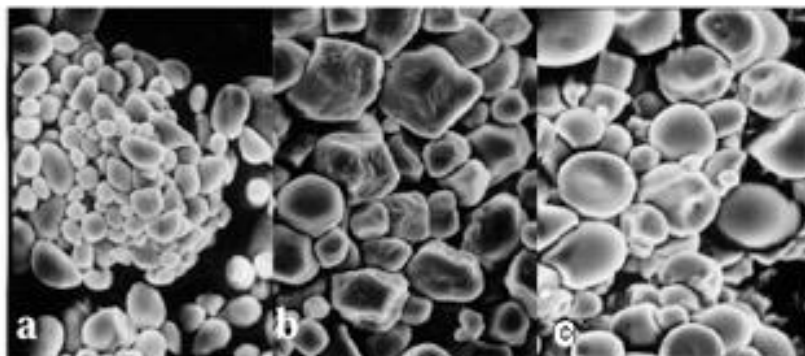
Danas u svetu postoji veliko interesovanje za uzgajanje hibrida kukuruza čijom bi se primenom kao sirovine poboljšala proizvodnja etanola. Razvijeni su hibridi sa većim sadržajem fermentabilnih šećera. U Americi, dve velike kompanije „Pioneer“ i „Monsanto“, ulažu napore da identifikuju i razviju nove hibride kukuruza, ispituju uticaj sredine na njihov rast, kao i uticaj sorte kukuruza na sastav korisnih sporednih proizvoda. Obe kompanije imaju komercijalne sorte kukuruza specijalno namenjene samo za proizvodnju bioetanola čijim korišćenjem je moguće ostvariti prinos etanola do 4% više nego kod klasičnih sorti kukuruza (što bi za proizvodnju etanola od 150 Mt godišnje značilo povećanje profita od 1-2 miliona dolara). Dalja istraživanja bi trebalo da podrazumevaju modifikaciju osobina skroba i drugih kompleksnih ugljenih hidrata u genetski modifikovanom kukuruzu [82]. Kod nas, u Institutu za kukuruz u Zemun Polju, ispitivani su i razvijeni hibridi kukuruza (sa oznakom ZP, NS i PKB) koji nam, pored

klasičnih sorti, pružaju mogućnost ispitivanja njihove primene radi poboljšanja ekonomičnosti proizvodnje etanola.

#### 2.4.2. Skrob

Skrob je prirodni polimer monosaharida  $\alpha$ -D-glukoze velikog stepena polimerizacije (osnovni gradivni elementi su ostaci  $\alpha$ -D-glukoze povezani glikozidnim vezama). Njegova bruto formula je  $(C_6H_{10}O_5)_n$  [83].

Skrob spada u grupu osnovnih biljnih rezervnih ugljenih hidrata. U biljkama se javlja u obliku karakterističnih zrnaca. Zrna skroba različitih biljaka razlikuju se po obliku, veličini i drugim fizičkim karakteristikama. Skrob krompira je najkrupniji, a najsitniji je kod pirinča i prosa. Kukuruzni skrob poseduje zrna u dva oblika u zavisnosti od porekla. Brašnaste sorte kukuruza imaju uglavnom okrugla zrna, dok su kod staklastih sorti poliedarskog oblika. U zavisnosti od vrste biljke veličina zrna skroba varira od 3 do 50  $\mu$ m. Kod kukuruza veličina zrna skroba je od 5 do 25  $\mu$ m [71, 84]. Na slici 2.2. je prikazana mikroskopska slika zrna skroba u kestenu, kukuruzu i kasavi [85].



Slika 2.2. Zrna skroba u: a) kestenu, b) kukuruzu i c) kasavi

Frakcionisanjem prirodnog skroba utvrđeno je da je on visokopolimerno jedinjenje koje se sastoji iz dva molekula - amiloze i amilopektina. Sadržaj amiloze u skrobu zavisi od vrste biljke i varira u širokim granicama, od 14-27% (w/w) [84]. Iako su i amiloza i amilopektin izgrađeni samo od  $\alpha$ -D-glukoze kao monosaharidne komponente, međusobno se znatno razlikuju (tabela 2.4.) [83].

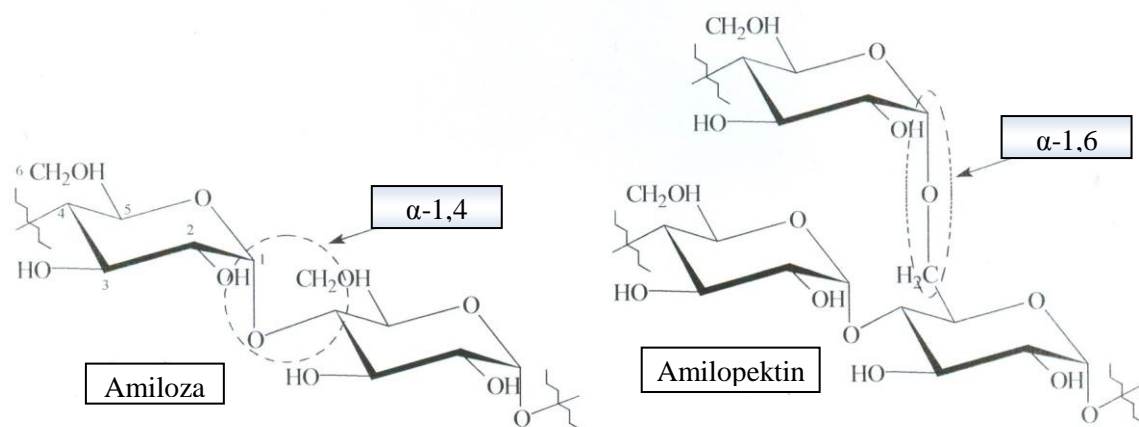
Tabela 2.4. Razlike u ponašanju amiloze i amilopektina [83]

	<b>Amiloza</b>	<b>Amilopektin</b>
Razlaganje $\beta$ -amilazom	~100%	~50%
Stepen polimerizacije	600-1.600	>10.000
Reakcija sa jodom	tamno plavo obojenje	purpurno ili crveno obojenje
Kompleks sa n-butanolom	gradi	ne gradi
Adsorpcija na celulozi	dobra	slaba
Odnos neredukujućih i redukujućih krajnjih grupa	1:1	100 n :1

**Amiloza** je dug savitljiv lančast makromolekul sa 600-1.600 glukozidnih jedinica, u piranoznom obliku, vezanih samo  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama. Odnos redukujućih i neredukujućih krajnjih grupa je 1:1. Razlaganje sa  $\beta$ -amilazom je skoro potpuno, što ukazuje da je amiloza nerazgranat molekul. Amiloza sa jodom daje plavo obojenje, a intenzitet obojenja varira u zavisnosti od dužine niza amiloze. Kompleksi sa n-butanolom, masnim kiselinama, nitrobenzolom i timolom odlikuju se slabom rastvorljivošću i dobrom kristalizacijom, što je tehnički iskorišćeno za izdvajanje amiloze iz skroba. Polisaharidni niz amiloze je u vidu zavojnice, čiji je prečnik dovoljno velik da može da primi molekule joda i n-butanola [83].

**Amilopektin** je druga frakcija skroba i predstavlja razgranati polimer  $\alpha$ -D-glukoze povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama, ali i  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama koje izazivaju grananje molekula. Stepenn polimerizacije je preko 10.000. Dejstvom  $\beta$ -amilaze razlaže se približno oko 50% od ukupne mase molekula, što ukazuje na to da se radi o veoma razgranatom sistemu. Amilopektin ne gradi komplekse sa organskim rastvaračima, a sa jodom gradi komplekse crvene boje [83].

Na slici 2.3. prikazane su strukture amiloze i amilopektina [86].



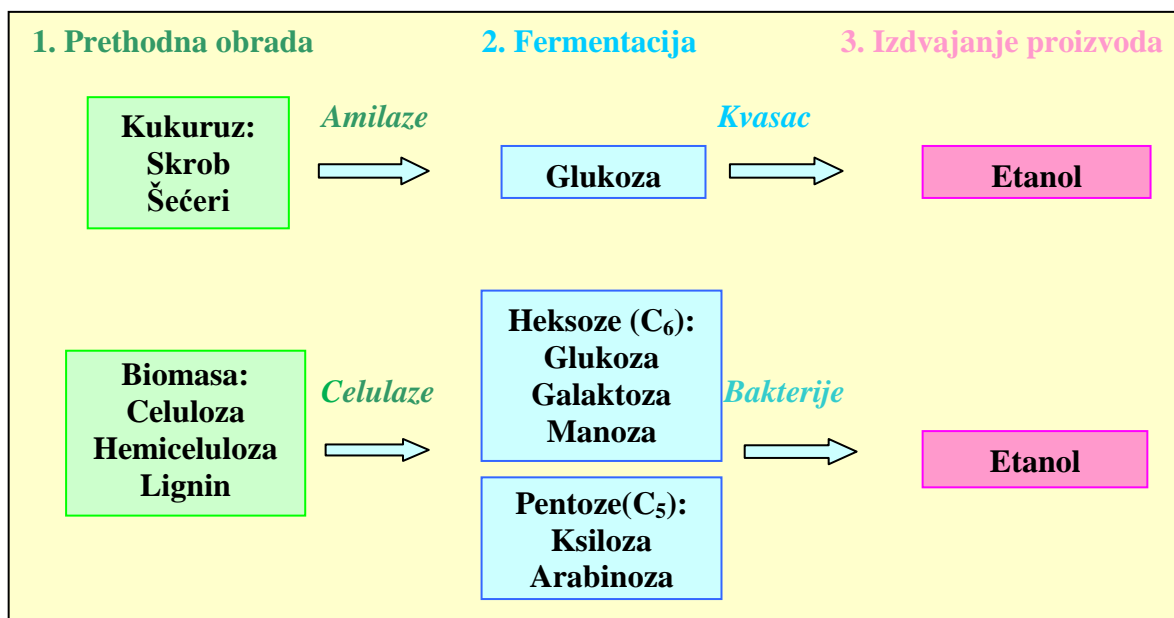
Slika 2.3. Strukture amiloze i amilopektina [86]

### 3. TEHNOLOGIJA PROZVODNJE BIOETANOLA

#### 3.1 OSNOVNE FAZE PROZVODNJE BIOETANOLA

Bioetanol se proizvodi fermentacijom šećera prisutnih u biomasi ili šećera dobijenih prethodnom enzimskom konverzijom sastojaka biomase. Fermentacija šećera se vrši pomoću mikroorganizama, i to tradicionalno pomoću kvasaca, a u novijim tehnologijama i pomoću određenih bakterija. Tehnologija za proizvodnju etanola se razlikuje u zavisnosti od vrste primenjene sirovine (supstrata) i globalno se može podeliti u tri faze (slika 3.1.):

1. *Prethodna obrada supstrata* (priprema sirovine)
2. *Fermentacija supstrata*
3. *Izdvajanje proizvoda* (destilacija, rektifikacija, prečišćavanje i obezvodnjavanje)



Slika 3.1. Uprošćena blok-šema dobijanja etanola iz biomase [4]

Faza prethodne obrade supstrata ima za cilj da se skrobne ili celulozne komponente iz biomase prevedu u fermentabilne šećere i vrši se pomoću enzima ili kiselina. Fermentabilni šećeri su oni šećeri koje mikroorganizmi mogu metabolisati, odnosno fermentisati do etanola, i to su uglavnom monosaharidi sa šest (glukoza, fruktoza, galaktoza, manoza) ili pet ugljenikovih jedinica (ksiloza, arabinoza), ili disaharidi (saharoza, maltoza, laktoza) [87]. Supstrati na bazi biomase koja je bogata šećerima, kao na primer šećerna repa, ne zahtevaju prethodnu enzimsku hidrolizu, već se priprema vrši usitnjavanjem radi ekstrakcije, razblaživanjem i usklađivanjem sa potrebama kvasca kako bi se direktno izvodila fermentacija do etanola [4].

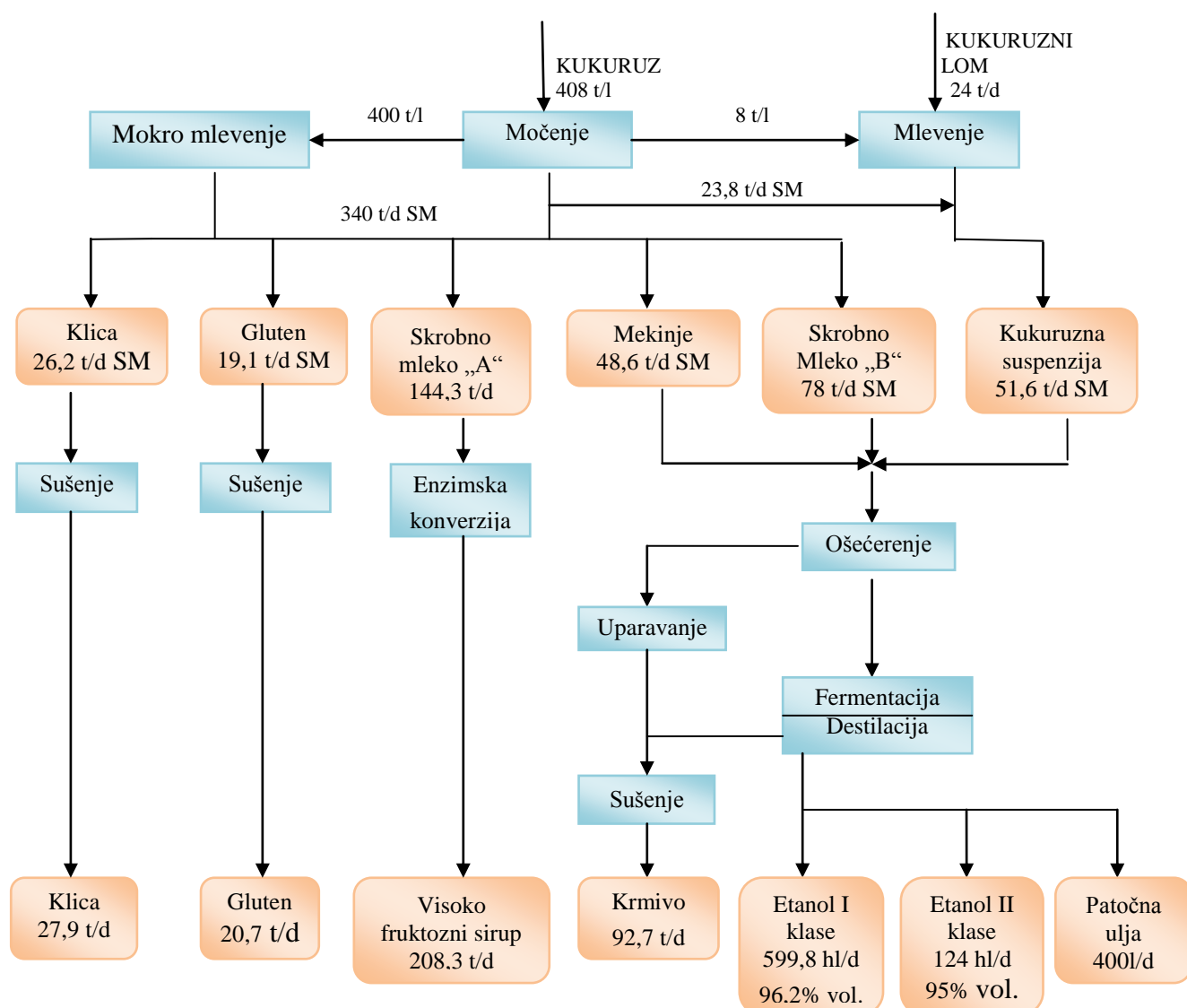
## **3.2. PRIPREMA SKROBNIH SIROVINA ZA ALKOHOLNU FERMENTACIJU**

### **3.2.1. Hidroliza kukuruznog skroba**

Razvijene su dve osnovne tehnološke šeme prerade skrobnih sirovina do skroba: postupak mokrog mlevenja i postupak suvog mlevenja. Oba ova postupka se mogu kombinovati ili primeniti za polaznu mehaničku pripremu kukuruza u proizvodnji bioetanola. Osnovne razlike su u količini i vrsti nastalih sporednih proizvoda. Postupak mokrog mlevenja je novijeg datuma, razvijen je krajem sedamdesetih i početkom osamdesetih godina XX veka. U ovom postupku se polazna sirovina (zrnevlje kukuruza ili drugih žitarica) prvo moči radi bolje ekstrakcije sporednih proizvoda i dobijanja čistijeg skroba, a zatim sledi mokro mlevenje, nakon čega se izdvajaju važni sporedni proizvodi - klica i gluten. Skrobno mleko nastalo mlevenjem (sitnija zrna skroba) se prerađuje u visoko fruktozni sirup kao sledeći značajan sporedni proizvod. Skrobno mleko (sa krupnijim zrnima skroba), izdrobljeni kukuruzni lom i mekinje podvrgavaju se ošećerenju (saharifikaciji), nakon čega slede fermentacija, destilacija i rektifikacija radi dobijanja etanola. Izdvojeni čvrsti (neošećereni) deo zrna se spaja sa džibrom, a zatim se uparavanjem i sušenjem prevodi u stočnu hranu. U postupku mokrog mlevenja nema otpadnih tokova, tako da je ukupno iskorišćenje postupka 99%. Tehnološka šema postupka



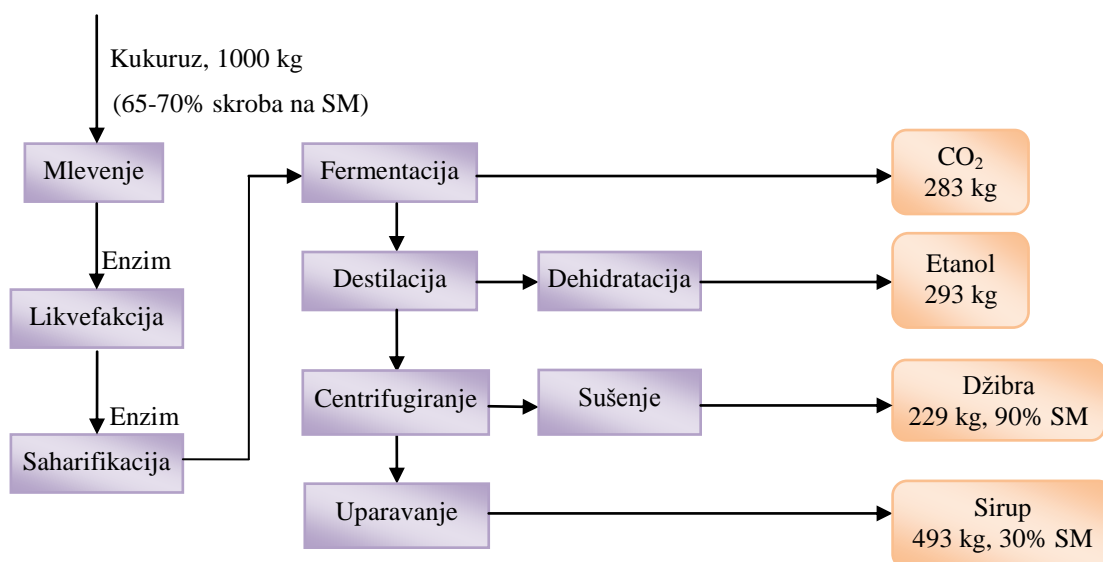
mokrog mlevenja i dobijanja etanola sa materijalnim bilansom i prikazom sporednih proizvoda prikazana je na slici 3.2. [39].



Slika 3.2. Tehnološka šema postupka mokrog mlevenja i dobijanja etanola iz kukuruza sa materijalnim bilansom i prikazom sporednih proizvoda [39]

Ukoliko se proizvodnja bioetanola vrši na kukuruzu pripremljenom suvim mlevenjem značajan sporedni proizvod je visoko kvalitetna džibra (koja se koristi kao stočna hrana) i ugljendioksid. Danas je u svetu zastupljeniji postupak suvog mlevenja (oko 67%) s obzirom da su ukupni troškovi po litri proizvedenog etanola dva do četiri puta manji nego kod primene postupka mokrog mlevenja (koji je zastupljen svega oko 33%), a i

sam tehnološki postupak je jednostavniji [81]. Tehnološka šema postupka suvog mlevenja i dobijanja etanola sa materijalnim bilansom i prikazom sporednih proizvoda prikazana je na slici 3.3. [4].



Slika 3.3. Tehnološka šema postupka suvog mlevenja i dobijanja etanola iz kukuruza sa materijalnim bilansom i prikazom sporednih proizvoda [4]

Kukuruz sadrži preko 70% ugljenih hidrata, od čega najviše skroba, dok celuloza i hemiceluloza čine oko 2%. Prva i veoma značajna faza u tehnološkom postupku proizvodnje bioetanola je hidroliza kukuruznog skroba. Osnovni cilj hidrolize je da se izvrši efikasna konverzija dve polimerne komponente skroba, amiloze i amilopektina, do fermentabilnih šećera koji se zatim mogu fermentisati do etanola pomoću određenih vrsta kvasaca ili bakterija. U procesu hidrolize razlikuju se tri postupka: kiselinski, kiselinsko-enzimski i dvojno-enzimski.

Ranijih godina je uglavnom korišćena hidroliza skroba kiselinama, ali je to zahtevalo velike utroške energije, postojanje sporednih proizvoda, tešku kontrolu procesa itd. **Kiselinska hidroliza** se izvodi pomoću sumporne ili hlorovodonične kiseline i zagrevanjem skrobne suspenzije (sa sadržajem suve materije od 30-40%) na temperaturu od 100 do 148 °C pri pH vrednosti od 1,5-2. Dejstvom kiselina može se izvršiti parcijalna ili potpuna hidroliza. Proizvodi parcijalne hidrolize su sirupi i hidrolizati skroba, a totalnom hidrolizom se dobija glukoza. Dobijeni hidrolizati pokazuju dobre filtracione osobine, ali dobijaju se i polimeri (koji boje rastvor) i visok

sadržaj pepela, pa postupci prečišćavanja dodatno poskupljuju proces. Osim toga, nespecifičnost dejstva kiselina rezultira u nastajanju sporednih proizvoda kao što je oksimetilfurfurol koji je nepostojan i dalje se razlaže na mravlju i levulinsku kiselinu. Ovi sporedni proizvodi smanjuju prinos željenog proizvoda, a zbog dodatne faze prečišćavanja proizvoda i velikih troškova usled izvođenja hidrolize na visokoj temperaturi i pritisku prešlo se na primenu enzimskog postupka hidrolize [71].

Kod *kiselinsko-enzimske hidrolize* skrob se prevodi u rastvor pomoću kiseline kao katalizatora i upotrebom povišene temperature i pritiska. Kod ovog postupka skrobna suspenzija (30-40% suve materije) se zagreva 5 min na temperaturi od 140 °C i podesi pH vrednost u intervalu od 2 do 5 dodatkom kiseline, pri čemu se vrši mehaničko i kiselinsko utečnjavanje. U slučaju suviše niske pH vrednosti dolazi do promene obojenosti i formiranja sporednih proizvoda, a pri suviše visokoj pH utečnjavanje skroba je nepotpuno. Nakon utečnjavanja smeša se hladi do temperature od 95 °C, pH podesi na 6-6,5 i dodaju enzimi, čime nastupa faza saharifikacije. Saharifikacija se odvija u fermentorima u kojima se vrši višestruka hidroliza oligosaharida dobijenih u fazi likvefakcije, na odgovarajućoj temperaturi. Osnovna prednost kombinovanog postupka je u tome što se dobijaju proizvodi koji se lako filtriraju i smanjuje se količina korišćenja enzima, ali zbog upotrebe kiseline takođe se formiraju i sporedni proizvodi koji smanjuju kvalitet i prinos glukoze [71].

Razvoj i usavršavanje tehnologije proizvodnje amilolitičkih enzima od strane kompanije "Novozymes" (Danska) doprinelo je razvoju ekonomski znatno povoljnijeg industrijskog postupka u odnosu na prethodne postupke, koji su da bi razorili kristalnu strukturu skroba koristili termički tretman na visokim temperaturama. Razvijen je takozvani "*dvostepeni hladni enzimski postupak*" koji se sastoji iz dve faze: *likvefakcije* i *saharifikacije* [88].

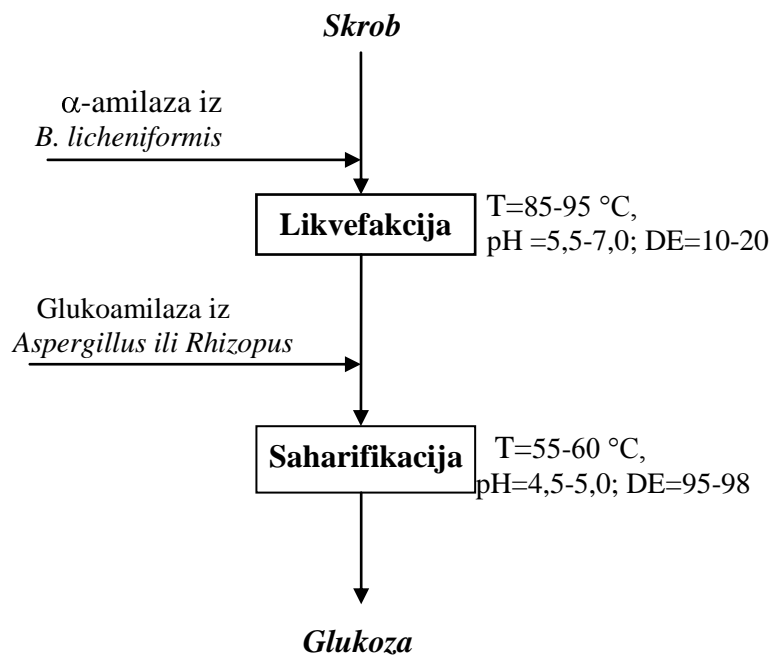
### 3.2.1.1. Dvojno-enzimski postupak hidrolize skroba

Dvojno-enzimski postupak hidrolize skroba je savremeno rešenje u kojem se koriste termostabilne amilaze koje omogućavaju hidrolizu na nižoj temperaturi i pritisku. Prema tome, osnovne prednosti ovakvog postupka su manja potrošnja energije i niži sadržaj neglukozidnih nečistoća. Potrošnja energije u toplom postupku razgradnje skroba iz kukuruza iznosi 2.449 MJ/t (6-8 MJ/l etanola), dok u hladnom iznosi svega 566 MJ/t (1-

3 MJ/l etanola) [2]. Dalje usavršavanje postupka razgradnje skroba podrazumeva uvođenje postupka kontinualne degradacije skroba [4].

**Likvefakcija** je prva faza dvojno-enzimske hidrolize skroba u kojoj dolazi do delimične hidrolize skroba uz smanjenje viskoznosti suspenzije. U ovoj fazi se koristi enzim termostabilna  $\alpha$ -amilaza koji vrši utečnjavanje skroba tako što hidrolizuje unutrašnje  $\alpha$ -D-(1-4)-glikozidne veze. Faza likvefakcije obuhvata: intenzivno mešanje polazne skrobne suspenzije, podešavanje pH vrednosti koja je odgovarajuća za dati enzim i zagrevanje smeše na temperaturu neophodnu za likvefakciju (85-110 °C) u toku 1-1,5 h. Sa povećanjem temperature skrob se želatinizira formirajući gustu kašu koja dejstvom enzima, po završetku likvefakcije, prelazi u tečnu smešu izgrađenu od dekstrina (kompleksnih šećera). Cilj likvefakcije je da se smanji viskoznost suspenzije, kao i dovođenje dekstroznog ekvivalenta do vrednosti između 10 i 20 u zavisnosti od količine dodatog enzima (dekstrozni ekvivalent DE predstavlja odnos redukujućih šećera izraženih kao glukoza i ukupnih ugljenih hidrata, računato na suhu materiju). Na brzinu likvefakcije utiče više faktora, kao što su: temperatura, brzina mešanja, pH vrednost, vreme trajanja likvefakcije, koncentracija supstrata, koncentracija enzima, dodatak  $\text{Ca}^{2+}$  jona itd. [88, 89].

Druga faza hidrolize skroba je **saharifikacija**. U ovoj fazi se koristi enzim glukoamilaza koji vrši dalju razgradnju skroba tako što hidrolizuje  $\alpha$ -D-(1-4) i  $\alpha$ -D-(1-6)-glikozidne veze počevši od neredukujućeg kraja makromolekula što dovodi do stvaranja glukoze kao krajnjeg proizvoda [90]. Saharifikacija skroba obuhvata: hlađenje smeše do optimalne temperature za glukoamilazu, podešavanje optimalne pH vrednosti, dodavanje odgovarajuće količine enzima uz konstantno mešanje i održavanje pH vrednosti sve dok se saharifikacija ne završi, što se utvrđuje merenjem sadržaja redukujućih šećera odnosno određivanjem DE vrednosti (na kraju hidrolize DE vrednost iznosi 97-98). Faktori koji utiču na efikasno odigravanje faze likvefakcije utiču takođe i na fazu saharifikacije. Ukoliko je pri kraju hidrolize koncentracija redukujućih šećera veoma visoka glukoamilaza može izvršiti polimerizaciju glukoze. Pritom najčešće nastaju izo-oblici, di- i tri- saharidi, i to izomaltoza i izomaltotrioza, zbog čega se smanjuje kvalitet i prinos željenog proizvoda [91]. Uprošćena šema hidrolize skroba pomoću  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze prikazana je na slici 3.4. [92].



Slika 3.4. Šema dvojno-enzimske hidrolize skroba [92]

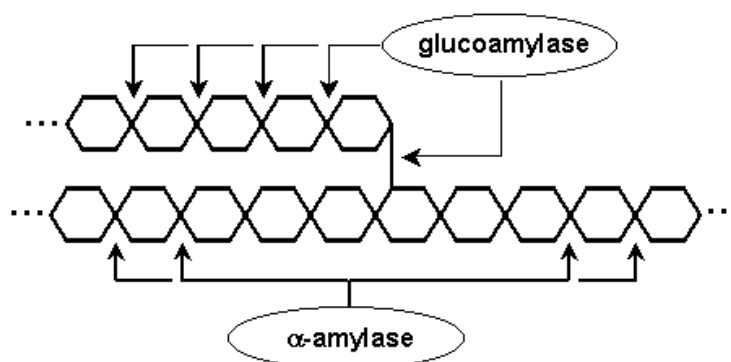
### 3.2.1.2. Enzimi koji katalizuju hidrolizu skroba

*Amilaze* (amilolitički enzimi) predstavljaju najvažnije hidrolitičke enzime koji katalizuju hidrolizu skroba. Rasprostranjeni su u biljnom i životinjskom svetu, i kod mikoorganizama. Klasifikuju se u tri grupe u zavisnosti na koji tip veze deluju:  $\alpha$ -amilaze,  $\beta$ -amilaze i glukoamilaze [90].

**$\alpha$ -amilaze** (endoamilaze) raskidaju  $\alpha$ -D-(1-4)-glikozidne veze u unutrašnjosti skroba nasumice usled čega naglo opada viskozitet rastvora skroba i smanjuje se intezitet boje kompleksa sa jodom. Kada naiđu na tačku grananja, tj. na  $\alpha$ -D-(1,6)-glikozidnu vezu, hidroliza se prekida. Rezultat dejstva  $\alpha$ -amilaza su dekstrini sa  $\alpha$ -konformacijom na prvom C-atomu, pa otuda i nose naziv  $\alpha$ -amilaze. Njihovo sistematsko ime je  $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolaza sa enzimskim brojem E.C: 3.2.1.1. [90]. Producenti  $\alpha$ -amilaza su plesni, kvasci, bakterije i aktinomicete, mada se uglavnom u njihovom industrijskom dobijanju koriste plesni (*Aspergillus oryzae*) i bakterije (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*). Prva korišćena  $\alpha$ -amilaza je amilaza iz *B. amyloliquefaciens*. Dalje usavršavanje tehnologije enzima u kompaniji „Novozymes“ dovelo je do primene termostabilne  $\alpha$ -amilaze dobijene iz *B. licheniformis* pod komercijalnim nazivom

Termamyl 120L ili Termamyl SC. Amilaze iz većine bakterija i plesni imaju pH optimum u kiselom i neutralnom opsegu (od 5 do 7). Optimalna radna temperatura je 65-70 °C, dok su  $\alpha$ -amilaze iz sojeva *Bacillus licheniformis* stabilne i na 90 °C.  $\alpha$ -amilaze su metaloenzimi, koji sadrže najmanje jedan  $\text{Ca}^{2+}$  jon. Prisustvo  $\text{Ca}^{2+}$  jona povećava termostabilnost  $\alpha$ -amilaze, a preporučene količine ovih jona su 40-60 ppm. S druge strane, određeni metalni joni (posebno teški metali), reagensi sa sulfhidrilnom grupom i EDTA (etilendiamintetraacetat) mogu da izvrše inhibiciju enzima [88, 93].  **$\beta$ -amilaze** (egzoamilaze) hidrolizuju  $\alpha$ -D-(1-4)-glikozidnu vezu počevši od neredukujućeg kraja makromolekula pa se zbog toga nazivaju egzoamilaze. Ovi enzimi otkidaju po jedan molekul maltoze i usled inverzije na prvom C-atomu dobija se maltoza  $\beta$ -konformacije (zbog čega se nazivaju  $\beta$ -amilaze). Kao i  $\alpha$ -amilaze, ni  $\beta$ -amilaze ne raskidaju  $\alpha$ -D-(1-6)-glikozidnu vezu i nemaju mogućnost da je zaobiđu. Kada se približe mestu grananja, hidroliza se prekida i dobijaju se granični dekstrini. Njihovo sistematsko ime je  $\alpha$ -1,4-glukan-4-maltohidrolaza sa enzimskim brojem E.C: 3.2.1.2. [90]. Međutim, prilikom dvojno-enzimske hidrolize skroba kako bi se kao krajnji proizvod dobila glukoza koristi se, kao što je već napomenuto, samo  $\alpha$ -amilaza (pod komercijalnim nazivom Termamyl 120L ili Termamyl SC firme „Novozymes“).

**Glukoamilaze** otkidaju po jedan molekul glukoze počevši od neredukujućeg kraja skrobnog polimera. Pored  $\alpha$ -D-(1,4)-glikozidne veze, ove amilaze raskidaju i  $\alpha$ -D-(1,6) i  $\alpha$ -D-(1,3)-glikozidne veze. Ipak, glukoamilaza nije u stanju da u potpunosti hidrolizuje skrob, ali ako je pored glukoamilaze prisutna i  $\alpha$ -amilaza, skrob se u potpunosti razgrađuje. Sistematsko ime ovog enzima je  $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukohidrolaza sa enzimskim brojem E.C: 3.2.1.3. [90]. Temperaturni optimum je 50-60 °C, dok sa povišenjem temperature drastično smanjuje aktivnost, a već na 85 °C se u roku od 5 min inaktiviše. Optimalna pH vrednost je između 4 i 5. Mnoge vrste plesni sposobne su da proizvedu glukoamilazu pod različitim uslovima, pri čemu se industrijska proizvodnja fokusira na proizvodnju iz *Aspergillus niger* i *Rhizopus oryzae*. Najpoznatiji komercijalni nazivi su (proizvođač „Novozymes“, Danska): SAN Extra L (iz *Aspergillus niger*), Spirizyme Plus FG i AMG 300L [94]. Na slici 3.5. šematski je prikazan način delovanja  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze na  $\alpha$ -D-(1,4) i  $\alpha$ -D-(1,6)-glikozidne veze u molekulu skroba kao polimeru monosaharida  $\alpha$ -D-glukoze.



Slika 3.5. Način delovanja  $\alpha$ -amilaze i glucoamilaze na  $\alpha$ -D-(1,4) i  $\alpha$ -D-(1,6)-glikozidne veze u molekulu skroba

Uprkos mnogobrojnim prednostima u odnosu na klasične hemijske katalizatore, šira industrijska primena enzima je onemogućena zbog visoke cene većine enzimskih postupaka. Naime, iako specifičnost katalitičkog dejstva enzima znatno pojednostavljuje i pojeftinjuje fazu prečišćavanja krajnjeg proizvoda, visoka cena samog enzima je često faktor koji određuje rentabilnost kompletnog procesa. Ukoliko se koriste nativni enzimi ne postoji mogućnost ponovljenog korišćenja, što značajno povećava cenu postupka. U cilju ostvarivanja bolje ekonomičnosti i višestrukog korišćenja razvijene su i patentirane različite tehnike imobilizacije enzima. Po definiciji, imobilisani enzimi su enzimi koji su lokalizovani u prostornoj oblasti ograničenoj imaginarnom ili fizičkom barijerom propustljivom za supstrate i proizvode reakcije, koji se mogu izdvojiti iz reakcione smeše. Postoje i druge definicije imobilisanog enzima. Tako se pod imobilizacijom podrazumeva prevođenje enzima rastvornog u vodi u enzim nerastvoran u vodi ili ograničavanje slobode kretanja molekula enzima u prostoru. Metode imobilizacije enzima mogu se svrati u četiri grupe: adsorpcija, kovalentno vezivanje za čvrst nosač, zarobljavanje u polimerne supstance i inkapsulacija [95]. Najčešće korišćena i ispitivana imobilizacija enzima je na aktivnom uglju, jonoizmenjivačkim smolama, zarobljavanje enzima u gelove i kovalentno vezivanje za nosač (kao nosač najviše se koriste silikagel i DEAE celuloza). Za ove nosače moguće je imobilisati amilazu i glucoamilazu, pojedinačno ili zajedno. Imobilizacija povećava čistoću finalnog proizvoda i smanjuje potrošnju samog enzima, kao i ukupne troškove proizvodnje bioetanol [4, 96].

### **3.2.2. Primena ultrazvuka i mikrotalasa kao predtretmana za dobijanje hidrolizata kukuruza**

#### **3.2.2.1. Predtretman ultrazvukom**

Ultrazvuk čine zvučni talasi čija je frekvencija iznad praga čujnosti ljudi ( $>15-20$  kHz) [97]. Glavni efekat ultrazvuka je u tome što vrši akustični pritisak na fluid, pored postojećeg hidrostatičkog pritiska. Akustični pritisak je sinusoidni talas koji zavisi od vremena, frekvencije i amplitude talasa maksimalnog pritiska [98].

Postoje tri opsega frekvencije ultrazvuka:

- ultrazvuk niskih frekvencija (16-100 kHz)
- ultrazvuk visokih frekvencija (100 kHz-1 MHz)
- dijagnostički ultrazvuk (1-10 MHz) [98].

Primena ultrazvuka, koji obuhvata ovako širok opseg frekvencija, može se podeliti u dve oblasti. Prva obuhvata korišćenje ultrazvuka visoke frekvencije od 1-10 MHz (odnosno male snage) u medicini i dijagnostičkoj analizi hrane (kao analitička tehnika za proveru kvaliteta, kontrolu procesa i nedestruktivnu inspekciju hrane). Druga oblast podrazumeva primenu ultrazvuka niske frekvencije od 16-100 kHz (odnosno velike snage) u postojećim procesima koji su poboljšani ovom tehnologijom i u razvijanju procesa koji do sada nisu bili mogući sa konvencionalnim izvorima energije. Ova kategorija ultrazvuka se koristi u procesima homogenizacije, emulzifikacije, kristalizacije, sušenja, mlevenja, ekstrakcije, filtracije, pasterizacije, separacije čvrste i tečne faze i fermentacije. Tek nedavno postao je efikasno sredstvo za komercijalnu upotrebu u procesima degaziranja, aktivacije i inaktivacije enzima, redukcije veličina čestica i promene viskoziteta. Ultrazvuk ima veliku primenu u nauci, medicini i industriji. Iako je dugo korišćen u istraživanjima i dijagnostici, glavni napredak je ostvaren poslednjih deset godina [98-101].

Ultrazvuk visokog intenziteta prouzrokuje razne promene tokom prolaska kroz medijum. Ove promene mogu da se objasne sa nekoliko mehanizama [102]:

- *Kavitacija:* Akustična kavitacija je formiranje, rast i implozija (unutrašnja eksplozija) mehurića kao rezultat fluktuacije pritiska. Naime, talasi ultrazvuka nastaju delovanjem mehaničkih vibracija koje imaju frekvenciju veću od 15-20 kHz. Širenjem ovih talasa



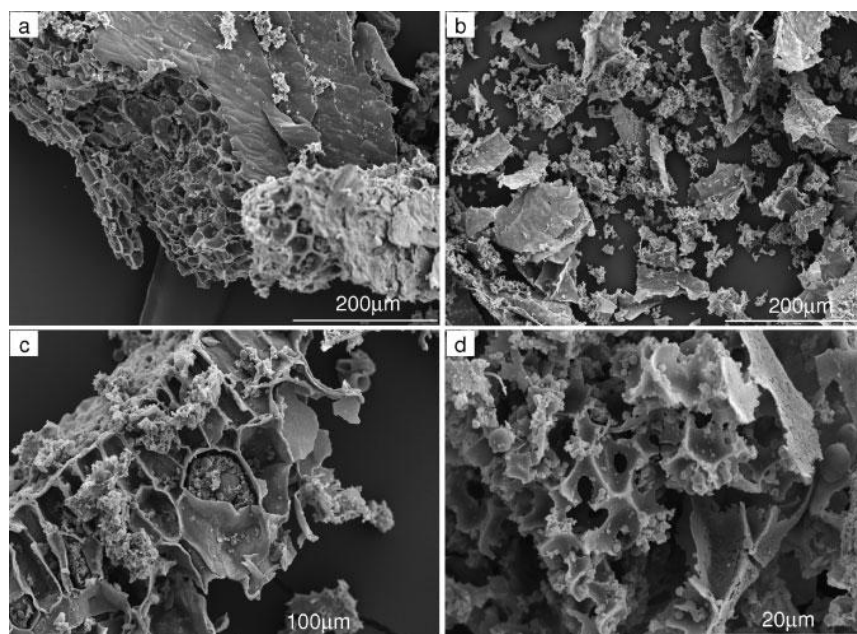
kroz tečni medijum dolazi do naizmeničnog pojavljivanja ciklusa komprimovanja (sabijanja) i ekspanzije (širenja). Pri manjem intezitetu (i visokoj frekvenciji) ultrazvuka dolazi do mešanja fluida i strujanja u akustičnom polju. Pri visokom intezitetu (i niskoj frekvenciji) lokalni pritisak pada ispod pritiska pare tečnosti prouzrokujući stvaranje mehurića. Dalje povećanje inteziteta izaziva negativni dinamički pritisak u fluidu pospešujući rast mehurića. Kada mehurići dostignu onu zapreminu pri kojoj ne mogu više absorbovati dovoljno energije dolazi do snažne implozije mehurića. Stvaranje velikih kavitacionih mehurića prouzrokuje povećanje temperature (oko 5.000 K) i pritiska (oko 50.000 kPa) fluida. Pri većim frekvencijama (>1 MHz) prestaje kavitacija i glavni mehanizam koji se javlja je akustično strujanje. Kavitacija u tečnostima može da izazove brzu i potpunu degazaciju; inicira razne hemijske reakcije tako što generiše slobodne radikale; ubrzava hemijske reakcije omogućavajući lakše mešanje reaktanata; pospešuje reakciju polimerizacije ili depolimerizacije (trajno raskidajući hemijske veze u lancu polimera); povećava brzinu difuzije; stvara visoko koncentrovane emulzije ili ujednačeno dispergovane čestice; pomaže ekstrakciju supstancija (npr. enzima iz biljnih ili životinjskih ćelija ili mikroorganizama); vrši sterilizaciju (mikrobicidnim delovanjem na nepoželjne mikroorganizme); uklanja viruse iz inficiranog tkiva itd. [97, 98, 102, 103].

- *Zagrevanje*: usled akustičnog strujanja i kavitacije dolazi do poboljšanja prenosa toplote, čime se znatno može ubrzati postupak zagrevanja proizvoda u industrijskoj praksi [102].
- *Strukturalni efekti*: Ukoliko se fluid izloži dejstvu ultrazvuka visokog inteziteta može se uticati na njihove strukturne karakteristike, kao što je promena viskoziteta [102].
- *Kompresija i širenje*: Kada akustična energija visokog intenziteta prolazi kroz čvrstu materiju zvučni talasi izazivaju niz brzih i uzastopnih sabijanja i širenja, brzinom koja zavisi od frekvencije. Ovaj mehanizam je poznat kao „rektifikaciona difuzija” i značajan je za akustično sušenje i uklanjanje vlage iz materijala. Materijali velike čvrstoće se dejstvom ultrazvuka „razbijaju” tako što se usled akustičnog stresa stvaraju mikrokanali za prolazak i uklanjanje vode. Isti mehanizam uzrokuje smanjenje ili povećanje pritiska na granici faza tečno-gasovito čime se ubrzava proces isparavanja [102].

- *Turbulencija:* Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje intenzivno mešanje u tečnostima i gasovima, omogućavajući time bolju disperziju čestica. Na granici faza tečno-čvrsto i gasovito-čvrsto akustični talasi izazivaju ekstremne turbulencije poznate kao akustično strujanje ili mikrostrujanje. Na ovaj način se povećava prenos mase i značajno ubrzava proces difuzije u sistemima gde to nije moguće običnim mešanjem [102].
- *Drugi mehanizmi:* Postoji izvestan broj drugih mehanizama i efekata. Ultrazvuk niske frekvencije može poboljšati prenos supstrata tokom fermentacije i stimulisati rast i razvoj ćelija. Takođe, zbog jakih kavitacija i mogućeg zagrevanja može se uticati na inaktivaciju enzima [98, 102].

Primena ultrazvuka kao predtretmana za dobijanje hidrolizata kukuruza može dovesti do sledećih efekata. Ultrazvuk visoke snage ima potencijal da smanji veličinu zrna skroba u kukuruza i da oslobodi skrob vezan za lipide (amiloza-lipidni kompleks) usled akustične kavitacije. Smanjenje veličine zrna skroba direktno zavisi od primenjene snage ultrazvuka i vremena soniciranja. Smatra se da ultrazvuk ubrzava proces depolimerizacije skroba. Ultrasonična depolimerizacija se primenjuje na mnoge homo i heteropolisaharide, kao što su dekstrani, pululan, hitozan, ksiloglukan i skrob [97, 101, 103, 104]. Khanal i saradnici [97] su ispitivali uticaj ultrazvuka kao predtretmana u proizvodnji etanola iz kukuruza. U svom radu su utvrdili da delovanjem ultrazvuka dolazi do dezintegracije ćelija, razbijanja ćelijskog zida, stvaranja mikrospora i dobijanja fragmetisanog ćelijskog materijala, kao i do smanjenja veličine zrna skroba i do 20 puta, što je prikazano na slici 3.6.

Usled poboljšane razgradnje i hidrolize kukuruznog skroba dolazi i do većeg izdvajanja redukujućih šećera iz kukuruza upotrebom ultrazvuka pre faze likvefakcije i saharifikacije, što dovodi i do povećanja prinosa etanola [97]. Produžavanjem vremena soniciranja, pri konstantnom intenzitetu ultrazvuka, povećava se sadržaj redukujućih šećera nakon završene hidrolize. Međutim, kako predtretman ultrazvukom zahteva i veliku potrošnju energije potrebno je da se pri što kraćem vremenu soniciranja postigne zadovoljavajući stepen razgradnje molekula skroba [104].



Slika 3.6. SEM slika kukuruzne suspenzije: a) sirov kukuruz (kontrola), b) sirovi sonicirani kukuruz, c) kuvani kukuruz (kontrola), d) kuvani sonicirani kukuruz. Uslovi soniciranja:

$$\tau=40 \text{ s, } \nu=20 \text{ kHz [97]}$$

Prednost upotrebe ultrazvuka je i u tome što obezbeđuje efikasnije mešanje (usled akustičnog strujanja) koje omogućava bolji prenos toplote unutar suspenzije.

Tokom predtretmana ultrazvukom redukcija veličine kukuruznog skroba i izloženost enzima većoj kontaktnoj površini utiču na povećanje aktivnosti enzima. Ultrazvuk takođe potpomaže bolji prenos mase enzima zahvaljujući intenzivnom mešanju. Ovo nam pruža mogućnost smanjenja količine upotrebljenog enzima u procesu hidrolize. Samim tim, smatra se da enzimi dodati tokom sonifikacije dovode do većeg oslobađanja glukoze nego dodatak enzima posle sonifikacije. S druge strane, ultrazvučni predtretman može i da degradira i denaturiše enzime zbog lokalnog zagrevanja, sonohemijских reakcija i intenzivnih sila smicanja ukoliko su enzimi dodati pre sonikacije [97, 98].

S obzirom da se primenom ultrazvuka poboljšava razgradnja skroba i kompletna konverzija skroba do glukoze ujedno se dobija i hidrolizat koji pokazuje dobre filtracione osobine, odnosno značajno se smanjuje viskozitet suspenzije. Promena viskoziteta može biti trajna ili privremena u zavisnosti od inteziteta upotrebljenog ultrazvuka [97, 98].

### 3.2.2.2. *Predtretman mikrotalasima*

Mikrotalasi su elektromagnetni talasi frekvencije od 0,3 do 300 GHz, i predstavljaju alternativni metod konvencionalnog načina zagrevanja. Njihova praktična primena započeta je u XX veku (1931. god.). Najviše se koriste u domaćinstvima (za pripremu hrane u mikrotalasnim pećima), a tek se poslednjih godina počelo sa intezivnom upotrebom mikrotalasa u industriji [105].

Zagrevanje mikrotalasima pruža određene prednosti u odnosu na konvencionalne načine zagrevanja, kao što su smanjeno početno vreme zagrevanja (postizanje željene temperature je znatno brže), smanjenje ukupnog vremena zagrevanja, veća energetska efikasnost, bolja kontrola procesa i selektivno zagrevanje. Razlika u odnosu na konvencionalan način zagrevanja je uticaj mikrotalasa na kvalitet proizvoda. Razlike u kvalitetu su posledica nedovoljno ispitanih i potpuno različitih mehanizama prenosa toplote i mase, kao i interakcije između mikrotalasa i individualnih polarnih molekula [106].

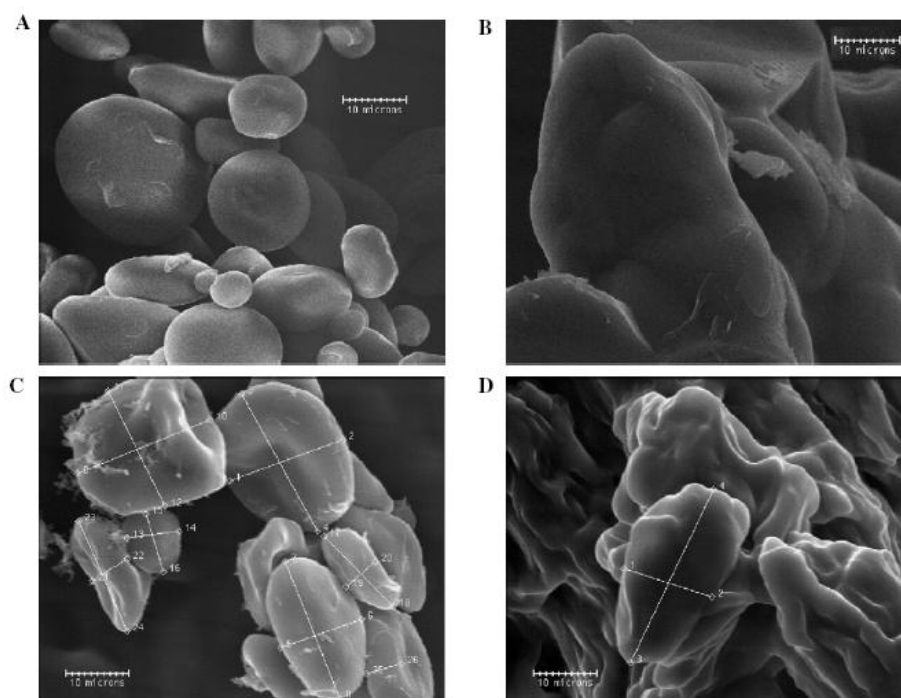
Mehanizam delovanja mikrotalasa je potpuno različit u odnosu na konvencionalni način zagrevanja, a i pored intezivnog izučavanja nije u potpunosti poznat. Jedan od načina da se objasni uticaj i mehanizam dejstva mikrotalasa jeste upravo preko toplote koja se produkuje tokom zagrevanja (postigne se znatno veća temperatura nego kod konvencionalnog zagrevanja), a koja je posledica trenja nastalog usled rotacionih sila koje se javljaju u samom molekulu. Ova pojava je posledica apsorpcije energije mikrotalasa od strane polarnih molekula i njihove potrebe da se orijentišu u pravcu oscilovanja električnog polja mikrotalasa. Veoma brza promena orijentacije molekula stvara toplotu jer dolazi do cepanja molekula i raskidanja slabih vodoničnih veza [105, 106].

Danas se intezivno vrše ispitivanja vezana za primenu mikrotalasa u proizvodnji etanola u cilju optimizacije procesa proizvodnje i dobijanja što većeg prinosa etanola. Istraživanja se baziraju na uticaju mikrotalasa na hidrolizu skroba, linearizaciju molekula skroba kako bi postao dostupniji dejstvu enzima, i dobijanju hidrolizata sa što većom koncentracijom glukoze [62, 105-108].

Mikrotalasi utiču na bubrenje zrna skroba i njegovu želatinizaciju, i samim tim mogu biti veoma efikasni u razaranju kristalne strukture skroba [107]. Želatinizacija skroba predstavlja nepovratne kumulativne promene koje se javljaju kod zrna skroba u prisustvu

vlage i toplote. Ove promene obuhvataju bubrenje zrna skroba (amorfni delovi zrna abosrbuju vlagu), razlaganje molekula polimera i izdvajanje amiloze, gubitak kristalne strukture, izdvajanje krupnijih fragmenta skroba kao što je amilopektin, i na kraju potpuno rastvaranje skroba [105]. Upravo zbog različitog mehanizma mikrotalasnog zagrevanja javljaju se i razlike u procesu želatinizacije skroba tokom predtretmana mikrotalasima. U svom radu Palav i Seetharaman [105] su eksperimentalno dokazali da kod uzoraka tretiranih mikrotalasima gubitak kristalne strukture se javlja na nižoj temperaturi u odnosu konvencionalni način konduccionog zagrevanja. Oni smatraju da mikrotalasi izazivaju vibraciona kretanja molekula vode prisutnih u okolini kristalne strukture skroba i da se kao posledica tog dejstva razara struktura zrna i pre dostizanja temperature želatinizacije. Kod konduccionog zagrevanja zrna skroba zadržavaju svoju strukturu čak i na temperaturi od 90 °C. Međutim, pri ovako visokim temperaturama izostaje faza bubrenja zrna skroba kod mikrotalsnog zagrevanja i odmah nastupa razaranje molekula skroba. Palav i Seetharaman [106] su u svom radu prikazali mikroskopske slike sirovog skroba (kontrole) i skroba tretiranog mikrotalsima. Na slici 3.7. može se videti uticaj mikrotalasa na razaranje strukture zrna skroba i u kom stepenu se vrši deformacija zrna kao posledica različitog vremena dejstva mikrotalasa. Na slici 3.7.C može se uočiti da nije došlo do bubrenja i značajnih promena dimenzija skrobnih zrna, a sa produženjem vremena mikrotalasnog zagrevanja razara se struktura zrna skroba koji na svojoj površini imaju formiran film razloženih polimera.

Implementacija predtretmana mikrotalasima na industrijskom nivou podrazumeva sagledavanje i pozitivnih i negativnih strana primene ove tehnologije. Naime, potrebno je usaglasiti postignute visoke prinose etanola i uspostavljene optimalne uslove procesa sa visokom ukupnom potrošnjem energije tokom mikrotalasnog zagrevanja. Neophodno je izvršiti analizu prednosti korišćenja ove tehnologije i procenu ukupnih troškova s obzirom na to da su početna kapitalna ulaganja i troškovi samog predtretmana mikrotalasnim zagrevanjem veoma visoki [108].

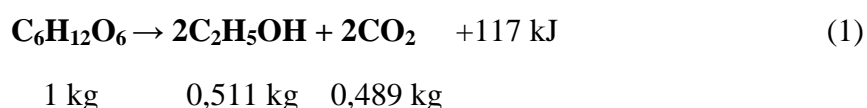


Slika 3.7. SEM slika zrna skroba: A) sirovi skrob (kontrola), B) skrob tretiran konvencionalnim načinom zagrevanja, C) suspenzija skroba nakon 10 s zagrevanja mikrotalasima (94,8 °C), D) suspenzija skroba nakon 30 s zagrevanja mikrotalasima (98,6 °C). Uslovi rada: snaga mikrotalasa 1.140 W, koncentracija suspenzije 33% [106]

### 3.3. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Fermentacija šećera je faza koja sledi nakon pripreme supstrata, i u klasičnim postupcima se izvodi najčešće pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na temperaturi od oko 30 °C. Pored ove vrste kvasca u industrijskoj praksi se koriste i kvasci *Saccharomyces carlsbergensis* (*pastorianus*), *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Kluyveromyces* vrste. Osim kvasaca koriste se i određene bakterije koje mogu proizvoditi etanol (*Zymomonas mobilis*, *Clostridium sporogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* i *Thermoanaerobacter ethanolicus*) ali se one manje primenjuju u industriji osim u posebnim slučajevima [55, 56, 109-111].

Reakcija alkoholne fermentacije se odvija u specijalno konstruisanim sudovima – fermentorima, uglavnom pod anaerobnim uslovima, iako su kvasci fakultativni anaerobi (mogu fermentisati šećere i pod aerobnim i anaerobnim uslovima). Alkoholna fermentacija podrazumeva biohemijsku transformaciju ugljenih hidrata, pre svega monosaharida glukoze, u etanol i ugljendioksid, pod anaerobnim uslovima, uz oslobađanje određene količine energije koju je potrebno odvoditi iz sistema, prema Gay-Lussac-ovoj jednačini:



Prema navedenoj jednačini može se videti da se po jedinici (kilogramu) fermentisane glukoze može ostvariti teorijski prinos od 0,51 kg etanola. Međutim, stvarni prinos koji se može ostvariti u toku fermentacije supstrata zavisi od vrste šećera koji se fermentiše, vrste mikroorganizama i primenjenih procesnih uslova (pH, temperatura, mešanje, koncentracija šećera u hranjivoj podlozi, koncentracija drugih izvora supstrata neophodnih za metabolizam proizvodnog mikroorganizma, efikasna eliminacija infekcije, stroga usmerenost metabolizma mikroorganizma u pravcu stvaranja etanola, eventualno prisustvo inhibitora u hranjivoj podlozi itd.). U dobro koncipiranim postupcima stvarni prinos se kreće oko 90-95% od teorijskog prinosa [4].

### 3.3.1. Faktori koji utiču na tok i efikasnost alkoholne fermentacije

Od mnogobrojnih faktora koji utiču na tok i efikasnost alkoholne fermentacije detaljnije će biti opisani sledeći: aeracija, temperatura, pH, sastav supstrata, mikrobiološka kontaminacija bakterijama mlečne i sirćetne kiseline, prisustvo inhibitora u hranljivoj podlozi i karakteristike proizvodnog mikroorganizma [112].

Iako je proizvodnja etanola anaeroban proces kvascu je neophodno obezbediti *kiseonik* da bi se omogućio razvoj i umnožavanje kvasca. To se postiže aeracijom podloge vazduhom tokom prva 2-3 h. Naime, kiseonik je neophodan za sintezu sterola i nezasićenih masnih kiselina koji su značajni za strukturu i funkcionisanje citoplazmatične membrane. Kiseonik je takođe bitan za ciklizaciju skvalena do lanosterola, oksidativno demetilovanje i

za desaturaciju zasićenih masnih acetyl-CoA jedinjenja. Količina kiseonika koja je potrebna za dovoljnu sintezu sterola i zadovoljavajuću fermentaciju razlikuje se za različite sojeve kvasaca. Kada se sav kiseonik iz podloge potroši, sadržaj sterola u ćelijama i brzina apsorpcije nutrijenata počinje da opada i kvasac menja svoju metaboličku aktivnost. S obzirom na direktnu vezu između sinteze sterola i rasta kvasca, količina sterola koja se nalazi unutar populacije kvasca određuje brzinu i stepen fermentacije [112-114].

**Temperatura** na kojoj se izvodi alkoholna fermentacija utiče na respiracionu i fermentacionu aktivnost kvasca. Optimalna temperatura zavisi od velikog broja faktora i nije potpuno definisana, ali se može reći da se nalazi u opsegu od 25-30 °C. To je temperatura koja istovremeno obezbeđuje brzu fermentaciju, a pri tome ne ometa razmnožavanje kvasaca, uz postizanje što potpunije transformacije šećera u etanol i ugljendioksid. Na višim temperaturama fermentacija je brža i intezivnija, ali nastaje veća količina sporednih metabolita što otežava kasniju izolaciju etanola. Na nižim temperaturama potpunija je fermentacija šećera i veća je koncentracija etanola. Kvasci su osetljivi na etanol na višim temperaturama (sa povećanjem temperature za svakih 10 °C povećava se smrtnost ćelija kvasca od etanola 10 puta). Temperature na kojima kvasac gubi moć fermentacije su kritične temperature i kreću se iznad 34 °C [4, 112, 113].

**pH** vrednost supstrata značajno utiče na tok alkoholne fermentacije. Optimalne pH vrednosti se kreću u opsegu od 4 do 6. Vrednosti pH niže od 2,6 značajno ometaju fermentaciju, dok se na većim pH vrednostima formiraju veće koncentracije glicerina i organskih kiselina na račun etanola [112, 113].

**Sastav supstrata** direktno utiče na fiziološka svojstva kvasca od kojih zavisi dinamika procesa fermentacije i kvalitet gotovog proizvoda. Esencijalna funkcija supstrata je da obezbedi najpogodnije hranljive materije za rast i fermentacionu aktivnost izabranog proizvodnog mikroorganizma. Supstrat mora da sadrži propisanu koncentraciju fermentabilnih šećera, odnosno izvore ugljenika i asimilativnog azota, faktore rasta i potrebne mineralne materije. Alkoholna fermentacija se najbolje odvija pri koncentraciji šećera od 15-18%, a sve do 25% se odvija nesmetano. Radi racionalnije proizvodnje etanola, potrebno je da u komini od kukuruznog skroba bude što veća koncentracija fermentabilnih šećera. Međutim, to je praćeno nizom problema i sa fiziološkog i sa biotehnološkog aspekta. Koncentrovane komine sporije fermentišu zbog delovanja nepovoljnih faktora: povećana gustina, slabiji prenos mase i toplote, povećana



koncentracija alkohola koja deluje inhibitorno, veći pritisak i veća koncentracija ugljendioksida. Da bi se navedeni problemi ublažili povećava se količina starter kulture, revitalizuje se kvasac pre zasejavanja, dodaju se protektori osmoze itd. Zbog opadanja vitalnosti kvasca preporučuje se da se kvasac recirkuliše ili da se pre zasejavanja revitalizuje. Da bi se umanjilo nepovoljno delovanje visokog osmotskog pritiska i povećane koncentracije alkohola vršena su ispitivanja mogućnosti zaštite kvasca dodatkom pojedinih protekturnih supstanci. Utvrđeno je da glicin, prolin i glicin-betain značajno umanjuju osmotski šok kod kvasca i ubrzavaju asimilaciju glukoze. U toku alkoholne fermentacije zahtevi za azotnim nutrijentima se obezbeđuju preko amino kiselina i peptida male molekulske mase. Od amino kiselina, kvasci uglavnom koriste samo L-oblik. Izuzetak čine glutaminska kiselina, asparaginska kiselina i asparagin, koji i u L-obliku i u D-obliku predstavljaju dobar izvor azota [112-114].

Dodatak mineralnih soli i vitamina pozitivno utiče na rast i viabilnost ćelija kvasca i povećava efikasnost alkoholne fermentacije [115]. Količine ovih mikronutrijenata koje je potrebno dodati supstratu zavise od sirovine koja se koristi za proizvodnju etanola. Mineralne soli i vitamini su neophodni za odvijanje biohemijskih reakcija u ćeliji, odnosno učestvuju u metabolizmu kvasca kao aktivatori enzima ili ulaze u sastav pojedinih delova ćelije [116].

Ćelije kvasca zahtevaju vitamine za svoj rast, kao što su mezoinozitol, pantotenska kiselina, biotin, tiamin, nikotinska kiselina i piridoksin [115]. Pantotenska kiselina je deo acetyl-CoA koji učestvuje u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i proteina. Ovaj vitamin povećava tolerantnost kvasca na etanol jer stimuliše sintezu lipida [116]. Biotin predstavlja kofaktor mnogih enzima koji učestvuju u reakcijama karboksilacije, a učestvuje i u sintezi nukleinskih kiselina, proteina i masnih kiselina [115,117]. Mezoinozitol takođe predstavlja esencijalni faktor rasta kvasca i doprinosi povećanju viabilnosti ćelije i tolerantnosti kvasca na etanol [118]. Zahteve za piridoksinom i tiaminom imaju samo kvasci gornjeg vrenja (tiamin je uključen u reakcije dekarboksilacije) [112]. Nikotinska kiselina se koristi za sintezu  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  [114]. Alfenore i saradnici [115] su u svom radu prikazali da se dupliranjem količine dodatih vitamina na početku fermentacije povećava koncentracija viabilnih ćelija i brzina nastajanja etanola. Eksponencijalnim dodavanjem vitamina tokom fermentacije još više se povećava rast i viabilnost ćelija. Kao rezultat, kombinacija obe

strategije, odnosno i dupliranje količina vitamina i njihovo eksponencijano dodavanje, vodi ka većoj produktivnosti i prinosu etanola.

Za aktivnost kvasca su takođe neophodni izvori Zn, Mn, Mg, Ca, Cu, K, Fe, S i P. Mineralne soli učestvuju u metabolizmu kvasca kao aktivatori enzima ili kao delovi aktivnog centra enzima [119]. Joni metala ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ ) utiču na promenu brzine glikolize i konverzije piruvata do etanola, i samim tim utiču i na efikasnost alkoholne fermentacije [112]. Magnezijum je uključen u mnoge fiziološke funkcije – rast i razmnožavanje kvasca i enzimsku aktivnost, i ima značajnu ulogu u zaštiti kvasca od toksičnih količina etanola i visokih temperatura. Ukoliko supstrat ne sadrži dovoljne količine magnezijuma može doći do spore ili nekompletne fermentacije [120]. Cink utiče na aktivnost enzima kao što su alkoholdehidrogenaza, aldolaze, alkalna fosfataza, DNK i RNK polimeraza [121]. Fermentacija se značajno usporava padom koncentracije cinka ispod 0,1 mg/l. Koncentracija cinka iznad 0,6 mg/l usporava rast kvasca pod uslovom da koncentracija jona  $Mg^{2+}$  nije isto toliko visoka [112]. Bakar utiče na aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze i povećava efikasnost enzimske hidrolize [122]. Međutim, posebna pažnja se obraća na količine dodatog bakra – pri koncentracijama oko 1 mg/l bakar poboljšava prinos etanola, a pri visokim koncentracijama toksično deluje na viabilnost kvasca. Joni kalcijuma takođe utiču na povećanje efikasnosti konverzije skrobnih sirovina do etanola [123]. U ćeliji kvasca kalijum utiče na permeabilnost ćelijskog zida, a gvožđe ima posebnu ulogu u citohromima. Utvrđeno je da prisustvo pojedinih jona u određenim koncentracijama može negativno uticati na rast i aktivnost kvasca. Tako npr., srebro, kadmijum, živa i paladijum inhibiraju rast kvasca u koncentracijama od 1-10 mg/l, a litijum, berilijum, nikel, arsen, telur, bor i bakar u koncentracijama preko 50 mg/l i selen u koncentraciji od 500-600 mg/l [112].

Jedan od većih problema koji se može javiti tokom proizvodnje etanola je i **mikrobiološka kontaminacija izazvana bakterijama mlečne i sirćetne kiseline**, koja dovodi do smanjenog prinosa etanola tokom fermentacije. Većina kontaminanata među bakterijama mlečne kiseline pripada rodu *Lactobacillus*, a to su najčešće vrste *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum* i *L. paracasei*. Pored bakterija mlečne kiseline, nepovoljne su i sirćetne bakterije, kao što su *Acetobacter aceti*, *A. xylinum* i *A. pasteurianus* koje vrše oksidaciju alkohola. Mogu se javiti i buterne bakterije *Clostridium acetobutlicum* [124, 125].

Postoje dva načina pomoću kojih kontaminanti (bakterije) negativno utiču na kvasce. Prvi način je taj što su mlečna i sirćetna kiselina (u svom nedisosovanom obliku) kao krajnji proizvodi metabolizma ovih bakterija u stanju da inhibiraju rast kvasca, tako što difunduju u ćeliju kvasca kroz citoplazmatičnu membranu jer su rastvorne u njenim fosfolipidima. Zatim, ove kiseline disosuju ako je pH vrednost unutar ćelije veća od pH vrednosti van ćelije, što rezultira acidifikacijom citoplazme. Sam mehanizam dejstva mlečne kiseline na ćeliju kvasca još uvek nije objašnjen. Drugi način negativnog uticaja ovih bakterija je da predstavljaju konkurenciju kvascima u pogledu nutrijenata. Gram-pozitivne bakterije mlečne kiseline mogu tolerisati visoke temperature i niske pH vrednosti, i mogu da prežive i rastu veoma brzo (brže se razmnožavaju od kvasaca) pod uslovima u kojima se proizvodi etanol [125].

Jedan od načina kontrole bakterijske kontaminacije u industriji etanola je korišćenje antibiotika kao što su penicilin G, streptomycin, tetraciklin, virginiamicin i monenzin. Međutim, neodgovarajuće korišćenje antibiotika može dovesti do obrazovanja sojeva pojedinih bakterija koje pokazuju rezistentnost na određene antibiotike. Drugi način kontrole bakterijske kontaminacije je korišćenje povećanog inokuluma kvasca čime se postiže inhibicija bakterija, što rezultira u smanjenoj produkciji mlečne kiseline i povećanoj krajnjoj koncentraciji etanola. Standardna preporuka za količinu korišćenog inokuluma kvasca u industriji etanola je  $1 \times 10^6$  CFU/ml po % suve materije kukuruznog brašna. Narendranath i saradnici [126] smatraju da se kontaminacija bakterija ne može izbeći. Pritom, količina inokuluma od  $1 \times 10^7$  CFU/ml u hidrolizatu kukuruznog brašna može rezultovati u smanjenju oko 1% vol. etanola dobijenog dejstvom kvasaca, u zavisnosti od vrste bakterije. Pored navedene dve mogućnosti kontrole kontaminacije neophodno je stalno mikrobiološki kontrolisati proizvodnju etanola. Neophodna je kontrola kvasca, proizvodnog procesa, kontrola čišćenja uređaja, sudova, ventila i kontrola efikasnosti dejstva dezinfekcionih sredstava [112].

Jedan od značajnih faktora koji utiču na sam tok fermentacije je i ***moгуćnost pojave inhibicije***. Jedan od inhibitora rasta kvasaca i fermentacije je i sam etanol koji vrši nekompetativnu inhibiciju. Fosfolipidi u citoplazmatičnoj membrani značajno utiču na tolerantnost kvasaca na etanol [127]. Naime, etanol menja stepen polarnosti ćelijske membrane i citoplazme i na taj način negativno utiče na rast ćelije pri visokim koncentracijama etanola. Ovaj negativan uticaj se ogleda u povećanoj fluidnosti

membrane. Na povećanje tolerantnosti na etanol utiču povećana koncentracija vitamina, proteina i nezasićenih masnih kiselina u membrani [128]. Takođe povećanju tolerantnosti na etanol mogu doprineti drugi fiziološki faktori kao što su: sastav hranljive podloge, akumulacija etanola unutar ćelije, temperatura i osmotski pritisak [109]. Trehaloza predstavlja i stabilizator membrane i ima zaštitinu ulogu u kvašćevim ćelijama pri stanjima stresa, tako da se smatra da njena koncentracija unutar ćelije ima važnu ulogu u sposobnosti kvasca da toleriše visoke koncentracije etanola. Naime, toksičan uticaj etanola raste sa porastom temperature. Kvasac *S. uvarum* obično je manje tolerantan na etanol u odnosu na *S. cerevisiae*. Ispitivanja faktora koji utiču na toleranciju kvasca na etanol pokazala su da se mnogi problemi mogu prevazići primenom određenih azotnih jedinjenja, sterola i nezasićenih masnih kiselina. Smatra se da tolerancija na etanol nije svojstvena soju već je određena uslovima fermentacije [112].

Pored tolerantnosti na etanol, tolerantnost na visoke temperature se smatra značajnom karakteristikom komercijanih sojeva kvasaca. Smatra se da visoke temperature uzrokuju povećanu fluidnost membrane, a kvasci podležu ovoj fizičkoj promeni menjajući sastav svojih masnih kiselina. Povećanje temperature vodi ka stvaranju zasićenih esterifikovanih masnih kiselina kao što je palmitinska kiselina i palmitoleinska kiselina u ćelijskoj membrani kvasca o trošku nezasićenih masnih kiselina (oleinska i linoleinska kiselina). Ovo je najčešće povezano sa smanjenjem količine fosfolipida u membrani koji održavaju optimalnu fluidnost membrane radi ćelijskih aktivnosti. Povećanje temperature pored promena u membrani uzrokuje i sintezu proteina kao odgovor na toplotni šok, koji imaju važnu ulogu kod tolerantnosti kvasca na etanol i temperaturu kod različitih mikroorganizama. Izazivač njihove indukcije je akumulacija delimično denaturisanih proteina. Akumulacija trehaloze je takođe povezana sa toplotnim stresom ćelije, jer koncentracija trehaloze u ćeliji može uticati na otpornost kvasca na toplotu. I toplota i etanol izazivaju promene u ćelijskoj membrani i denaturaciju proteina, kao i inhibiciju glikolize i učestale mutacije. Takođe, povećavaju permeabilnost citoplazmatične membrane, što rezultira u povećanom ulasku protona koji menja elektrohemijski potencijal citoplazmatične membrane, što utiče na korišćenje nutrijenata i regulaciju pH vrednosti u ćeliji [109].

### 3.3.2. Karakteristike proizvodnih mikroorganizama

#### 3.3.2.1. Kvasci

##### 3.3.2.1.1. Istorija, rasprostranjenost i morfološke karakteristike kvasaca

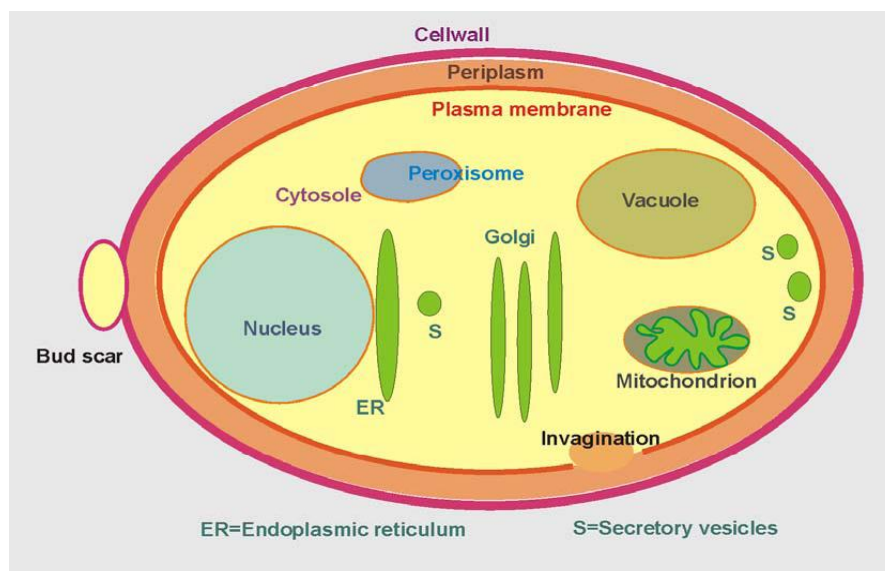
Svi termini koji se koriste za kvasac: u engleskom jeziku *yeast*, u holandskom jeziku *guist*, u nemačkom jeziku *hefe*, proistekli su iz zapadno-nemačkog izraza *haf-jon* što znači prouzrokovati vrenje. Grčka reč *zymi* (ζυμη) se koristi i za kvasce i za testo, i javlja se kao koren reči kod mnogih termina vezanih za pivo ili fermentaciju. Naime, moderan izraz za enzim potiče od reči *en zymi* što znači „u kvascu“ [129].

Smatra se da su kvasci najstariji mikroorganizmi koji su se koristili u domaćinstvu. U periodu od 6000-2000. god. pre nove ere kvasci su se koristili u pravljenju piva u Vaviloniji, u pravljenju testa u Egiptu itd. Upravo zbog svojih jedinstvenih karakteristika i ogromnog sakrivenog potencijala koji se koristio hiljadama godina, kvasci su postali predmet mnogih istraživanja. Godine 1680. kvasac je prvi put posmatran pod mikroskopom (Antonie van Leeuwenhoek). Luj Paster je 1866. god. bio prvi koji je dokazao da su ćelije kvasca zaslužne za konveziju groždanog šećera u etanol, i da je fermentacija fiziološki a ne čisto hemijski proces kako je tvrdio Libig. Upravo sredinom 1800-tih godina, sa radom Pastera u Francuskoj i Hansena u Danskoj, koji su proučavali mikrobiološki aspekt fermentacije piva i vina, otpočelo je naučno i tehnološko razumevanje uloge kvasca u proizvodnji hrane i pića. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je prvi opisani kvasac (J. Meyen, 1838. god.), a već decenijama predstavlja najbolje genetički i fiziološki okarakterisan eukariotski organizam. Naziv ovog kvasca označava šećernu plesan („*saccharomyces*“) i pivo („*cerevisiae*“) na galskom jeziku *kerevigia* ili starom francuskom jeziku *cervoise*. Dalje, značajna je primena kvasca u proizvodnji glicerola (od 1915. god.), predstavljanje fiziologije kvasca (1920. god.) i prve genetičke mape (1949. god., Lindegren), ustanovljenje strukture tRNK iz kvasca (1966. god.) i proizvodnja prvih komercijalnih farmaceutskih proizvoda iz rekombinantnih kvasaca (1990.-1994. god., hepatitis B vakcina). Poslednjih godina, u proizvodnji bioetanola pored

klasičnih metoda za dobijanje efikasnijeg proizvodnog mikroorganizma, koriste se i metode genetičkog inženjerstva [129].

Kvasci su veoma rasprostranjeni u prirodi. Nalaze se u zemljištu, voću, lišću biljaka, u medu i voćnim sokovima, na površini delova biljaka, u prašini, u vodi, u prehrambenim proizvodima, na koži ljudi i životinja, u mleku, u traktu insekata itd. Industrijski značaj kvasaca je veoma veliki, naročito u fermentacionoj i prehrambenoj industriji (proizvodnja etanola, piva, vina, pekarskog kvasca, stočne hrane i dr.) [113].

Po strukturnim i funkcionalnim karakteristikama kvasci pripadaju eukariotima. Čelije kvasca pokazuju veliku raznolikost po pitanju veličine, oblika i boje. Najčešće su u obliku elipse i veličine oko  $6 \times 3 \mu\text{m}$ . Oblik i veličina ćelije zavise od vrste kvasca, kao i od sredine u kojoj rastu. U tečnoj sredini ćelije kvasca teže da zauzmu okrugli oblik, a na čvrstoj podlozi ćelije se izdužuju, često formirajući pseudomiceliju. Čelije kvasca sadrže sledeća makromolekulska jedinjenja: proteine, glukoproteine, polisaharide, polifosfate, lipide i nukleinske kiseline. Osnovni delovi ćelije i organele su: ćelijski zid, periplazma, citoplazmatična membrana, citoplazma, jedro i jedarce, mitohondrije, endoplazmatični retikulum, Goldžijev aparat, vakuola, peroksizomi i sekretorne vezikule, što se može videti na slici 3.8. [113, 129].



Slika 3.8. Šema organela i delova ćelije kvasca [129]

### 3.3.2.1.2. Klasifikacija kvasaca

Veoma je rasprostranjena podela pravih gljiva *Eumycota* na tri empirijske grupe: plesni, kvasci i pečurke. Naziv kvasci ne predstavlja sistematsku kategoriju ni u botanici ni u mikologiji. Kvasci, i kvascima slični organizmi, čine različite sistematske grupe (klase i porodice) između kojih je teško postaviti granicu na osnovu ispitivanja samo morfoloških i fizioloških karakteristika. Stoga, prava filogenetska klasifikacija kvasaca predstavlja dosta težak zadatak.

Prva klasifikacija izvršena je na osnovu određenih morfoloških i fizioloških osobina, i ima izrazito veštački karakter. Naime, prema svojim biohemijskim odnosno fiziološkim osobinama, kvasci se mogu podeliti na sledeće tri grupe: a) oksidativni kvasci (rodovi: *Cryptococcus*, *Candida* i *Rhodotorula*) koji ne vrše fermentaciju šećera i pretežno se vrši aerobna disimilacija; b) oksidativno-fermentativni kvasci (rodovi: *Hansenula*, *Pichia* i *Torulopsis*) koji vrše aerobnu i anaerobnu disimilaciju, i ako vrše fermentaciju kao glavni proizvod su estri, a ne etanol; i c) fermentativni kvasci (rodovi: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* i *Kloeckera*) koji vrše anaerobnu disimilaciju i fermentišu šećere do etanola i ugljendioksida [113].

Kvasci pogodni za alkoholnu fermentaciju, odnosno fermentativni kvasci koji se koriste u proizvodnji etanola, su askosporogeni iz klase *Ascomycetes*, odnosno vrste kvasaca iz roda *Saccharomyces* i *Schizosaccharomyces* [113]. Prvobitna klasifikacija ovih kvasaca po Loder-u je sledeća [130]:

Kraljevstvo: *Fungi*

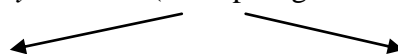
Razdeo: *Eumycota*

Klasa: *Ascomycetes* (formiraju askuse)

Podklasa: *Gymnoascomycetidae* (sa otkrivenim askusima)

Red: *Endomycetales* (sa razbacanim askusima)

Porodica: *Saccharomycetaceae* (askosporogeni kvasci)



Podporodica: *Saccharomycetoideae*  
(multipolarno pupljenje)

Podporodica: *Schizosaccharomycetoideae*  
(deljenje)

Rod: *Saccharomyces*

Rod: *Schizosaccharomyces*

Ovde je prikazan taksonomski put do najvažnijih rodova *Saccharomyces* i *Schizosaccharomyces*. Važno je naglasiti da prema Loderovoj klasifikaciji ovi kvasci se dele na tri porodice: *Saccharomycetaceae* (askosporogeni kvasci), *Cryptococcaceae* (anaskosporeni kvasci) i *Sporobolomycetaceae* (stvaraju spore slične bazidiosporama). Porodica *Saccharomycetaceae* obuhvata četiri podporodice: *Saccharomycetideae*, *Schizosaccharomycetoideae*, *Nadsonioideae* i *Lipomycetoideae* [113, 130].

Morfološke i fiziološke karakteristike su tradicionalno pružale bogatstvo informacija koje su korišćene za ustanovljenje niza sistema za klasifikaciju kvasaca, i osnova su tzv. „konvencionalne taksonomije“. Danas je identifikacija i klasifikacija kvasaca pod značajnim uticajem napretka u molekularnoj biologiji i genetici. Iako se morfološki i fiziološki testovi i dalje primenjuju, ograničenja u korišćenju konvencionalne taksonomije dovela su do primene metoda molekularne i genetičke taksonomije. Moderne metode klasifikacije se baziraju na genetičkoj analizi mikroorganizama i omogućavaju što prirodniju klasifikaciju (ne zavise od starosti ćelije, spoljašnjih činilaca za razliku od fenotipskih koje podležu varijaciji). Prve molekularne metode koje su korišćene za klasifikaciju kvasaca su: a) određivanje frekvencije G+C parova (ukoliko je razlika u sadržaju G+C između 2-3% posmatrani mikroorganizmi pripadaju različitim vrstama) i b) DNK homologija (hibridizacija nukleinskih kiselina). Sličan G+C sastav ne znači i blisku srodnost organizama jer sekvence gena mogu biti različite bez obzira što je procenat G+C baznih parova isti. Ostale molekularne metode koje su se pokazale korisne za klasifikaciju kvasaca su DNK restrikcija, DNK sekvenciranje 26S rRNK, PCR i dr. [131, 132]. Stoga, tokom godina podela ovih kvasaca je doživela različite promene, pa je savremena klasifikacija kvasaca sledeća [133-135]:

Kraljevstvo: *Fungi* (C. Linnaeus, 1753. ex R.T. Moore, 1980.)

Podkraljevstvo: *Dikarya* (D. S. Hibbett, T.Y. James i Vigalys, 2007.)

Razdeo: *Ascomycota* (Berkely, 1857. ex T. Cavalier-Smith, 1998.)

Podrazdeo: *Saccharomycotina* (O.E. Eriksson i K. Winka, 1997.)

Klasa: *Saccharomycetes* (G. Winter, 1881. ex O.E. Eriksson i K. Winka, 1997.)

Red: *Saccharomycetales* (Kudrjanzev, 1960.)

Porodica: *Saccharomycetaceae* (G. Winter, 1881.)

Podporodica: *Saccharomycetoideae* (Kurtzman, 1982.)

Rod: *Saccharomyces* (J. Meyen ex E.C. Hansen, 1838.)



Rod *Schizosaccharomyces* (Linder, 1893.) pripada porodici *Shizosaccharomycetaceae* (Beijerinck ex Kloecker, 1905.), redu *Shizosaccharomycetales* (O.E. Eriksson, Svedskog i Landvik, 1993.), klasi *Shizosaccharomycetes* (O.E. Eriksson i K. Winka, 1997.), podrazdelu *Taphrinomycotina* (O.E. Eriksson i K. Winka, 1997.) i razdelu *Ascomycota* (Berkely, 1857. ex T. Cavalier-Smith, 1998.) [133-135].

Međutim, klasifikacija kvasaca koji pripadaju rodu *Saccharomyces* predstavlja težak zadatak, a poslednje promene u taksonomiji ovih kvasaca izvršene su 2005. godine. Naime, prvobitna ispitivanja kvasaca iz roda *Saccharomyces* datiraju još iz 1838. god. (J. Meyen) kada je i opisan prvi kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. M. Reess je 1870. god. definisao kvasce koji pripadaju ovom rodu, i u svojoj knjizi predstavio sve gljive koje učestvuju u alkoholnoj fermentaciji. E. C. Hansen je prvi koristio izabrane sojeve kvasaca kao starter kulture u pivarstvu („Carlsberg“ pivara u Danskoj) i uveo razliku između sojeva kvasaca gornjeg vrenja koje je nazvao *S. cerevisiae*, i sojeva kvasaca donjeg vrenja koje je objedinio pod nazivom *S. pastorianus*. A. Guilliermond je 1912. god. uveo prvi sistem za klasifikaciju kvasaca koji se bazirao na morfologiji ćelije i na nekoliko fizioloških testova (tabela 3.1.). U njegovoj monografiji „Le levures“ opisano je 20 vrsta kvasaca koji pripadaju rodu *Saccharomyces*. Nakon toga, sistem za klasifikaciju kvasaca progresivno raste (povećan je broj fizioloških i biohemijskih testova). U zavisnosti od primenjenih testova, kvasci su tokom godina grupisani na različite načine, a broj i imena vrsta su se takođe promenila. U tabeli 3.1. prikazane su promene u nazivima i grupisanju vrsta kvasaca u okviru kompleksa *Saccharomyces sensu stricto* prema najznačajnijim taksonomskim monografijama u periodu od 1912. do 1998. godine. Naime, kvasci koji pripadaju rodu *Saccharomyces* podeljeni su u dve grupe, u užem (*stricto*) i širem (*lato*) smislu, i to: *Saccharomyces sensu stricto* kompleks (imenovan od strane van der Walt-a 1970. godine) koga čine vrste kvasaca koje su striktno povezane sa fermentacionom industrijom, odnosno čine ga *S. cerevisiae* i kvasci bliski ovoj vrsti; i *Saccharomyces sensu lato* kompleks (obuhvata oko 100 vrsti kvasaca) [131].

Kao što se može videti iz tabele 3.1., od 2000. god., kompleks *Saccharomyces sensu stricto* obuhvata 6 vrsti: *S. cerevisiae* (Meyen ex Hansen, 1838.), *S. bayanus* (Saccardo, 1985.), *S. paradoxus* (Batchinskaju, 1914.), *S. cariocanus* (Naumov, 2000.), *S. kurdiavzevii* (Naumov, 2000.), *S. mikatae* (Naumov, 2000.), i jedan hibrid: *S. pastorianus*, sinonim za *S. carlsbergensis* (Hansen, 1904.) [136, 137].

Tabela 3.1. Promene u nazivima i grupisanju vrsta kvasaca u okviru kompleksa *Saccharomyces sensu stricto* prema najznačajnijim taksonomskim monografijama u periodu od 1912. do 1998. godine [131]

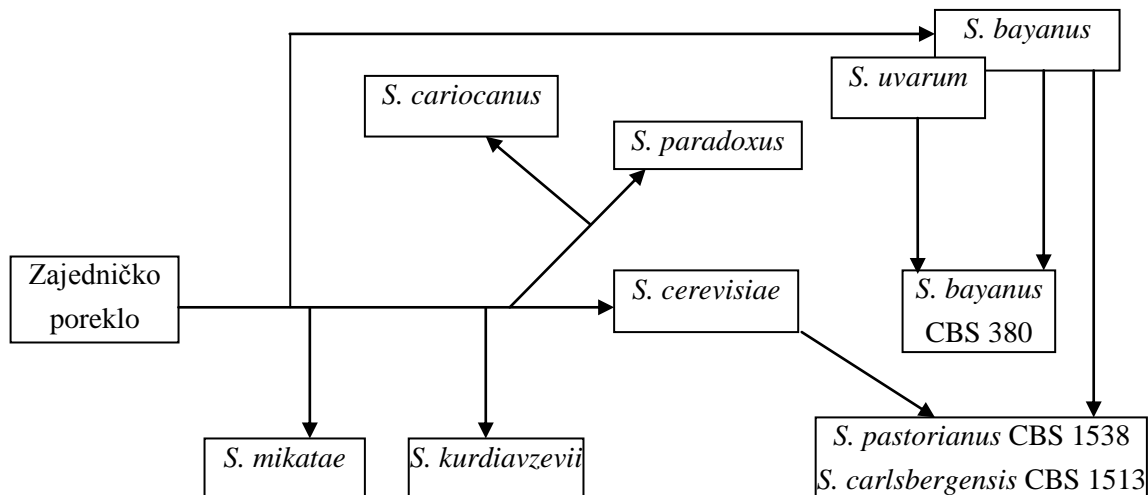
Guilliermond, 1912.	Lodder i Kreger van Rij, 1952.	Lodder, 1970.	Barnett, Payne i Yarrow, 1984.	Kurtzman i Fell, 1998. *
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. ellipsoideus</i> <i>S. turbidans</i> <i>S. ilicis</i> <i>S. vordermanni</i> <i>S. sake</i> <i>S. cartilagosus</i> <i>S. batatae</i> <i>S. tokyo</i> <i>S. yeddo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. paradoxus</i>
<i>S. willianus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. validus</i>	<i>S. willianus</i>			
<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>		
<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. monacensis</i>	<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i>	<i>S. uvarum</i>		
<i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i>	<i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. oviformis</i> <i>S. beticus</i>	<i>S. bayanus</i>		
	<i>S. heterogenicus</i>	<i>S. heterogenicus</i>		
	<i>S. chevalieri</i> <i>S. fructuum</i>	<i>S. chevalieri</i>		
	<i>S. italicus</i> <i>S. steineri</i>	<i>S. italicus</i>		
	<i>S. globosus</i>	<i>S. globosus</i>		
		<i>S. aceti</i> <i>S. prostoserdovi</i> <i>S. oleaginosus</i> <i>S. olaceus</i> <i>S. capensis</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. hispaniensis</i> <i>S. inusitatus</i> <i>S. norbensis</i> <i>S. abuliensis</i> <i>S. cordubensis</i> <i>S. gaditensis</i> <i>S. hispalensis</i>		

\*Tri nove vrste *Saccharomyces sensu stricto* kvasaca su uključene u ovu grupu 2000. godine, a to su: *S. cariocanus*, *S. kurdiavzevii* i *S. mikatae* [136]

Iako se ulažu značajni naponi za razjašnjenje taksonomije kvasaca koji pripadaju kompleksu *Saccharomyces sensu stricto*, diferencijacija ovih vrsta kvasaca je i dalje nedovoljno razjašnjena i još uvek se ne smatra tačnom, a brojna ispitivanja u skorije vreme pokazuju neadekvatnost ovakvog grupisanja posebno u vezi sa kvascima *S. bayanus* i *S. pastorianus*. Kvasac *S. bayanus* uključuje sve sojeve koji se koriste u proizvodnji vina, dok *S. pastorianus* obuhvata sve sojeve donjeg vrenja u pivarstvu. Specifični problemi potiču iz sklonosti ovih vrsta ka hibridizaciji i od fiziološke i genetičke heterogenosti kvasca *S. bayanus* [131, 138]. Vaughan-Martini i Kurtzman (1985. godine) su prvi ustanovili da je *S. pastorianus* (sinonimi: *S. carlsbergensis*, *S. monacensis*), predstavnik kvasaca donjeg vrenja, rezultat hibridizacije između *S. cerevisiae* i *S. bayanus*. Mitohondrijalna i ribozomalna DNK kvasca *S. pastorianus* potiče od *S. bayanus* (ostale sličnosti kvasaca *S. pastorianus* i *S. bayanus* su mogućnost rasta na nižim temperaturama i sposobnost previranja melibioze) [139, 140].

Raniji naponi da se pojednostavi klasifikacija *Saccharomyces* kvasaca stopili su *S. uvarum* u *S. cerevisiae* (Yarrow, 1984.) kao što je prikazano u tabeli 3.1. Međutim, 1998. god. *S. uvarum* se smatra kao sinonim za kvasac *S. bayanus* (Vaughan-Martini). Nguyen i Gaillardin su 2005. god. predložili ponovno ustanovljenje kvasca *S. uvarum* kao posebne vrste i ukinuli njen trenutni status kao sinonim za *S. bayanus*. Naziv *S. bayanus* sada opisuje hibrid *S. uvarum* i *S. cerevisiae* (slika 3.9.). Kompleks *Saccharomyces sensu stricto* je sada ponovo definisan i sadrži tri vrste: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* i *S. uvarum* i hibride između *S. cerevisiae* i *S. uvarum* koji su klasifikovani ili kao *S. bayanus* ili kao *S. pastorianus* [139].

Na slici 3.9. su prikazane vrste kvasaca *Saccharomyces sensu stricto* kompleksa koje su trenutno potvrđene i doprinose nehibridnih vrsta genetičkoj kompoziciji hibridnih grupa [131]. Najrazumljivije bi bilo da se usvoji pretpostavka da se vrste koje pripadaju kompleksu *Saccharomyces sensu stricto* značajno preklapaju kao što je predložio Petersen i saradnici [141], i da predstavljaju kontinuitet genomskih struktura koje nisu jasno razdvojene primenom metoda koje se trenutno koriste za određivanje vrsta [131].



Slika 3.9. Šematski prikaz *Saccharomyces sensu stricto* vrsta i hibrida [131]

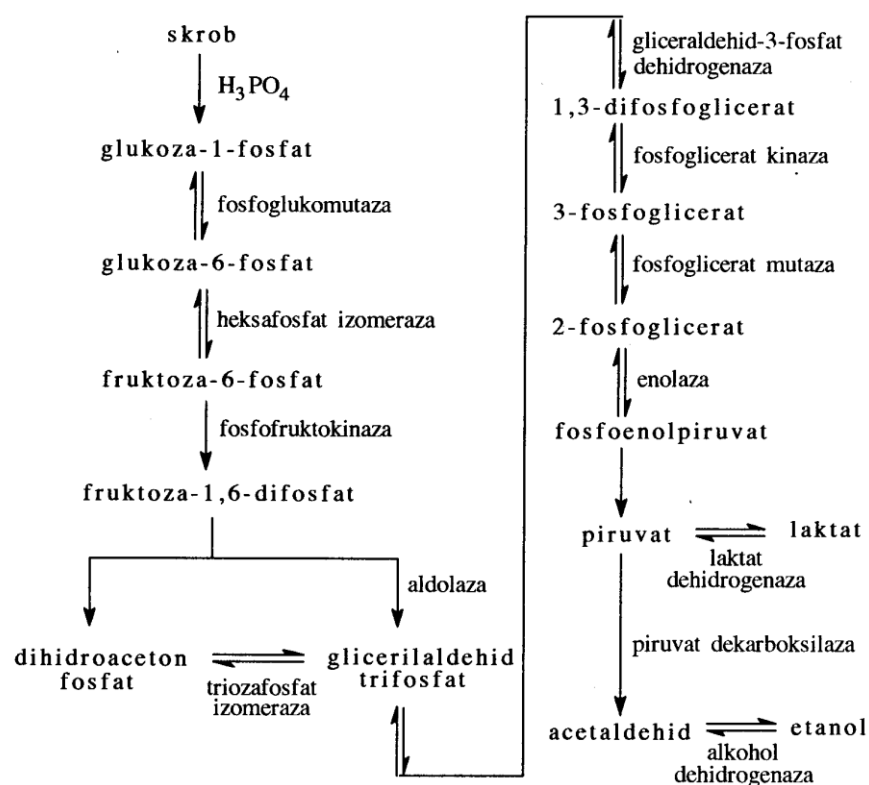
### 3.3.2.1.3. Metabolizam kvasaca

Neophodno je poznavati osnovne metaboličke procese kako bi u potpunosti iskoristili prednosti, odnosno mogućnosti nekog mikroorganizma da prevede supstrat u željeni proizvod. Metabolizam podrazumeva biohemijску asimilaciju (kod anaboličkih puteva) i disimilaciju (kod kataboličkih puteva) nutrijenata od strane ćelije. Svi metabolički putevi odvijaju se dejstvom enzima, i koriste  $\text{NADP}^+$  i  $\text{NAD}^+$  kao kofaktore. Anabolički putevi uključuju redukcijske procese koji vode ka proizvodnji novog ćelijskog materijala, dok su katabolički putevi procesi oksidacije putem kojih se uklanjaju elektroni iz supstrata ili intermedijera koji se koriste za dobijanje energije [114].

Većina kvasaca koristi šećere kao glavne izvora ugljenika i energije, ali postoje i određeni kvasci koji mogu koristiti nekonvencionalne izvore ugljenika. **Katabolizam ugljenih hidrata** se može odvijati u aerobnim i anaerobnim uslovima. Ove procese katališu specifični enzimski sistemi uz učesće i obrazovanje makroergičnih jedinjenja (ATP, ADP, GTP, UDP i dr.). Razlaganjem (katabolizmom) ugljenih hidrata ćelija se obezbeđuje ne samo korisnom energijom, već i značajnim intermedijarima koji se koriste za sintezu drugih složenih jedinjenja [114].

U anaerobnim uslovima ugljeni hidrati se razlažu preko osnovne građivne jedinice D-glukoze do piruvata putem procesa glikolize (slika 3.10.). Glikoliza je stupnjevit proces

koji je katalizovan od polienzimskog sistema koga čine 13 glavnih i nekoliko sporednih enzima. Ovaj proces razlaganja glukoze naziva se još i EMP put razlaganja (po naučnicima Embden, Mayerhof i Parnas). Pirogroždana kiselina (tj. njen aktivni oblik piruvat jon), kao krajnji proizvod glikolize podleže daljem procesu degradacije: respiraciji (u aerobnim uslovima) i fermentaciji (u anaerobnim uslovima) [114].

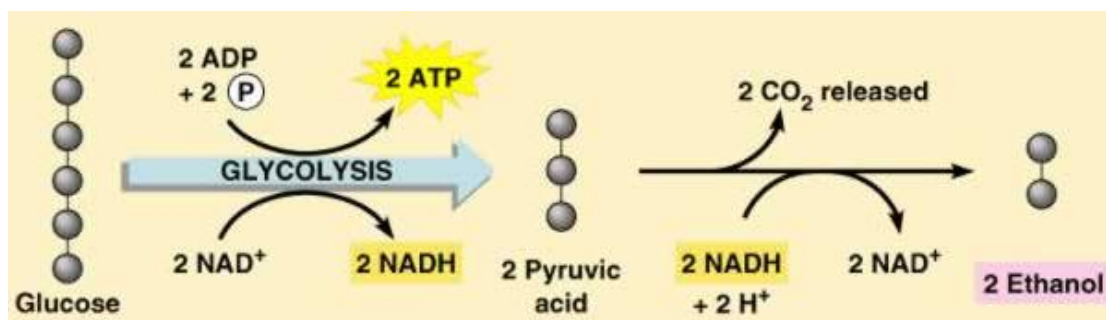


Slika 3.10. Šematski prikaz glikolitičkog razlaganja ugljenih hidrata [114]

U prisustvu kiseonika piruvat se prevodi u acetil-CoA putem oksidativne dekarboksilacije (u mitohondrijalnom matriksu) pomoću piruvat-dehidrogenaze. Ova reakcija povezuje glikolizu sa Krebsovim ciklusom (ciklusom limunske kiseline). U ovom ciklusu acetil-CoA potpuno oksidiše dajući dva molekula  $CO_2$  i reduktivne ekvivalente  $NADH+H^+$  i  $FAD\cdot H_2$  [114, 129].

U toku alkoholne fermentacije, transformacija pirogroždane kiseline u etanol i ugljendioksid se vrši u dve faze. U prvoj fazi se, pod uticajem enzima piruvat-dekarboksilaze i u prisustvu tiaminpirofosfata TPP, katalizuje dekarboksilacija piruvata i nastaje acetaldehid. U drugoj fazi se acetaldehid redukuje u etanol pomoću  $NADH+H^+$  i alkoholdehidrogenaze. U ovoj reakciji nastaju dva molekula etanola i dva molekula  $CO_2$ .

Centralni proizvod je ATP koji ćelije kvasca koriste u endergonskim reakcijama, dok su etanol i  $\text{CO}_2$  metabolički otpadni proizvodi [114]. Na slici 3.11. predstavljena je uprošćena šema sinteze etanola [142].



Slika 3.11. Šematski prikaz razgradnje glukoze do etanola [142]

Alternativni način oksidacije glukoze je heksoza-fosfatni ili pentoza-fosfatni put. Ovim putem se omogućuje proces konverzije heksoza u pentoze, koje su značajne za biosintezu nukleinskih kiselina. Pored toga, kao rezultat ovog metaboličkog puta nastaje veći broj molekula  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  koji se koriste za sintezu masnih kiselina, amino kiselina i dr. Pored heksoza kvasci koriste i nekonvencionalne izvore ugljenika kao što su biopolimeri, pentoze, alkoholi, polioli, ugljovodonici, masne kiseline i organske kiseline. Disaharidi, kao što su maltoza, saharoza, melibioza, laktoza i celibioza, mogu se koristiti kao nutrijenti u prisustvu hidrolaza koje hidrolizuju pomenute disaharide do monosaharida. Ostali biopolimeri kao što su skrob, inulin, celuloza, hemiceluloza i pektin, mogu se direktno koristiti kod nekih kvasaca (npr. *Saccharomyces diastaticus* koji se razvija na skrobnim sirovinama jer sintetizira enzim amilazu), dok je kod ostalih kvasaca potrebno izvršiti prethodnu hidrolizu polimera sa enzimima (koji nisu prisutni u ćeliji, amilolitičkim enzimima) da bi se mogli koristiti kao nutrijenti. Pomenuta hidroliza polimera se koristi upravo kod dobijanja bioetanola iz skrobnih sirovina. Pentozni šećeri mogu da fermentišu do etanola samo kod određenih vrsta kvasaca. Neki kvasci mogu koristiti i etanol i metanol.

Ukoliko kvasci rastu na supstratima koji nisu ugljeni hidrati kao izvorima ugljenika, neophodna je sinteza šećera za biosintezu makromolekula, naročito polisaharida. **Biosinteza ugljenih hidrata** vrši se procesom glukoneogeneze. Biosintetski put prevođenja

piruvata u glukozu odigrava se u mitohondrijama i citoplazmi procesom obrnutim glikolizi. Glikogen kao rezervni ugljeni hidrat dobija se iz glukoza-6-fosfata koji se prevodi u glukoza-1-fosfat, koji se dalje aktivira uz UTP dajući UDP-glukozu kao vrstu startera na koga se mogu nadovezati ostale monosaharidne jedinice.

**Katabolizam masti** započinje hidrolizom pod dejstvom lipaza i nastaju glicerol i masne kiseline. Glicerol se dalje fosforiluje i zatim se kao glicerol-fosfat uključuje u procese biosinteze masti, ili se dehidrogenuje pri čemu nastaje dihidroksiacetonfosfat koji se uključuje u glikolizu. **Katabolizam masnih kiselina** se vrši procesom  $\beta$ -oksidacije u peroksizomima, koji se razlikuje od sistema u mitohondrijama po učešću katalaza u oksidaciji  $FADH_2$  i po mehanizmu oksidacije  $NADH+H^+$ . **Biosinteza masti** je u uskoj vezi sa metabolizmom ugljenih hidrata jer se prekursori za biosintezu masti dobijaju oksidativnom dekarboksilacijom piruvata, pošto je osnovna gradivna jedinica masti acetyl-CoA. Sintaza se vrši dejstvom multienzimskog kompleksa koga čine enzimi iz grupe transacilaza i ligaza.

**Katabolizam proteina** se odigrava ili opštim putevima karakterističnim za većinu amino kiselina: dezaminacija, transaminacija i dekarboksilacija, ili specifičnim putevima karakterističnim za svaku amino kiselinu. Slobodne amino kiseline se jednim delom koriste za izgradnju proteina, a drugim delom se koriste za potpunu razgradnju do uree,  $CO_2$  i vode odnosno do međuproizvoda ciklusa uree. Za funkcionisanje kvasca neophodni su izvori azota koji učestvuju u izgradnji kvaščeve ćelijske mase, DNK, RNK, ATP, ADP i enzima. Azot je neophodan i zbog zaštite kvasca od toksičnog dejstva etanola u poslednjim fazama fermentacije. U slučaju nedovoljne količine azota u toku alkoholne fermentacije, smanjen je rast kvasca i u tom slučaju samo 70% glukoze se prevodi u etanol i  $CO_2$ , a ostatak se transformiše u glikogen [114, 129].

#### 3.3.2.1.4. Rast i razmnožavanje kod kvasaca

Za uspešno vođenje i regulaciju mikrobnog procesa neophodno je poznavati kinetiku mikrobnog rasta, koja se grafički može predstaviti pomoću *krive rasta*. Prema brzini rasta i razmnožavanja mikroorganizama, odnosno kvasaca, na krivoj se mogu razlikovati sledeće faze:

- lag faza (faza prilagođavanja)
- log faza (eksponecijalna ili logaritamska faza)
- stacionarna faza
- faza izumiranja mikroorganizama

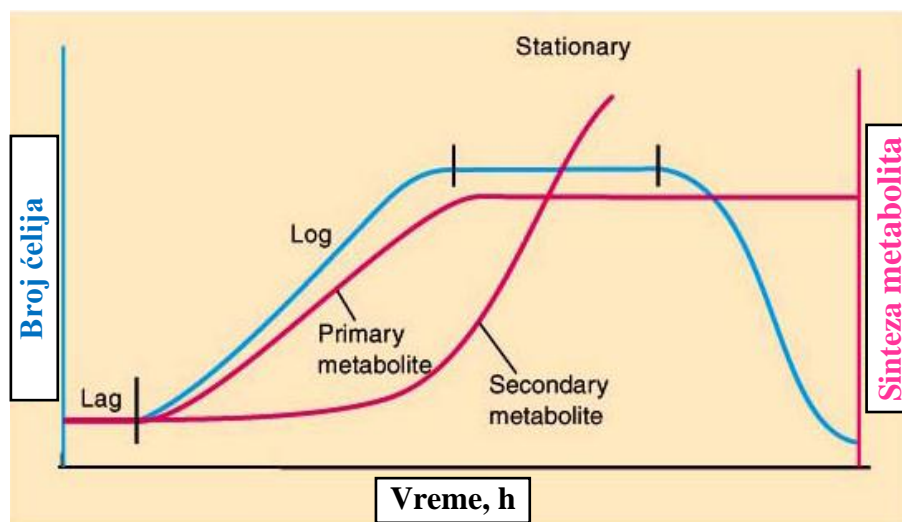
U *lag fazi* mikroorganizmi se prilagođavaju na uslove sredine, aktiviraju se postojeći i sintetizuju adaptivni enzimi, raste sadržaj nukleinskih kiselina tj. ćelija se priprema za intezivne procese biosinteze i rasta. Trajanje ove faze zavisi od uslova sredine i fizioloških karakteristika mikroorganizama. Ova faza traje kraće što su uslovi sredine optimalniji i ako su mikroorganizmi na njih adaptirani. Ova faza se sastoji iz dva dela. U prvom delu broj ćelija ne raste, dok se zapremina ćelija, ukupna protoplazma i sadržaj ribonukleinskih kiselina povećava tj. sintetizuju se ćelijski konstituenti. U drugom delu brzina razmnožavanja raste do maksimalnog broja koji se ostvaruje do kraja log faze, a takođe raste i protoplazma i zapremina ćelije.

*Log faza* je faza u kojoj dolazi do intezivnog razmnožavanja mikroorganizama. Broj mikroorganizama raste po geometrijskoj progresiji. U ovoj fazi se vrši intezivna razmena materije i energije između mikroorganizama i spoljne sredine, usled čega se sastav sredine stalno menja. Sadržaj hranljivih materija se postepeno smanjuje, a raste broj ćelija i koncentracija metabolita. Ova faza je od posebnog značaja za industrijsku proizvodnju jer se u njoj sintetizuje najveći broj proizvoda metabolizma tzv. primarni metaboliti: alkoholi, organske kiseline, ketoni, amino kiseline, nukleotidi, polisaharidi i vitamini. Mnogi od proizvoda metabolizma deluju inhibitory na rast i razmnožavanje ćelija, tako da kumulativnim delovanjem sa smanjivanjem i iscrpljivanjem hranljivih materija, rast ćelija se postepeno usporava i na taj način mikroorganizmi ulaze u sledeću fazu rasta.



U *stacionarnoj fazi* rasta isti broj mikroorganizama nastaje i nestaje. Naime, postoji i dalje razmena materija sa okolinom, ćelije i dalje rastu i razmnožavaju se, ali istovremeno ekvivalentan broj ćelija odumire usled delovanja nepovoljnih faktora. I u ovoj fazi dolazi do stvaranja vrlo značajnih proizvoda metabolizma tzv. sekundarnih metabolita: antibiotika, giberelina, bioloških pesticida i alkaloida. Nepovoljni faktori usled kojih dolazi do stacionarne faze su: iscrpljivanje nekog esencijalnog hranljivog sastojka, utrošak rastvorenog kiseonika, promene pH, nagomilavanje toksičnih materija itd.

U *fazi izumiranja* veći broj mikroorganizama nestaje nego što nastaje. Naime, u ovoj fazi hranljive materije iz sredine su utrošene, nagomilana je velika količina metabolita, i pošto ne postoje uslovi za rast, mikroorganizmi postepeno odumiru, pa se sadžaj mikrobne biomase u sistemu stalno smanjuje [113]. Na slici 3.12. grafički je prikazana zavisnost broja ćelija od vremena (kriva rasta), kao i sinteza primarnih i sekundarnih metabolita.



Slika 3.12. Kriva rasta mikroorganizama i sinteze metabolita

Razmnožavanje kod kvasaca može biti bespolno i polno. Jedan od načina vegetativnog (bespolnog) razmnožavanja je pupljenje. U početku se na površini ćelije formira mali izraštaj u vidu pupoljka koji se povećava sve dok ne dostigne karakterističnu veličinu za datu vrstu, nakon čega se odvaja od majke ćelije. Pupljenje započinje kada majka ćelija dostigne kritičnu veličinu, i kada ujedno počinje i sinteza DNK. Ovo je praćeno slabljenjem ćelijskog zida, povećanjem pritiska u ćeliji i izlaskom citoplazme u

oblast ograničenu ćelijskim zidom nove ćelije. Ključno u pojavljivanju pupoljka je regulacija enzima neophodnih za sintezu ćelijskog zida, kao i transport receptora citoplazmatične membrane pupoljka. Hitin formira prsten između majke ćelija i pupoljka, i nakon separacije hitin ostaje na majki ćeliji u vidu ožiljka (na osnovu ožiljka može se odrediti starost ćelije). Nastao pupoljak dobija oblik ćelije majke i podudaran je sa njom u pogledu citoplazme i jedarnog aparata koji obuhvata mehanizam genetske kontrole i narednog pupljenja. Karakteristično za svaku vrstu je raspored i broj pupoljaka, njihovo odvajanje i povezanost novonastale ćelije sa majkom ćelijom. Novonastale ćelije mogu da nastave i same da pupe, usled čega se stvaraju razgranati nizovi i grozdovi ćelija kvasca. Vegetativno se kvasci mogu razmnožavati i deljenjem ili kombinovano (pupljenjem i deljenjem). Kvasci iz roda *Saccharomyces* razmnožavaju se pupljenjem, dok je za kvasce iz roda *Schizosaccharomyces* karakteristično razmnožavanje deljenjem [113, 129].

Istraživanja su pokazala da ćelije dok pupe imaju sposobnost da proizvode etanol više od 30 puta brže nego ćelije koje su u miru. Kada sadržaj etanola dostigne vrednost oko 11-12% smanjuje se broj ćelija koje pupe i stres (usled povećanog sadržaja etanola) na ćelije se povećava. Kao što je već napomenuto nivo trehaloze u membranama utiče na tolerantnost kvasca na etanol. Kompanija Alltech je pronašla da kada je sadržaj trehaloze u kvascu visok istovremeno se mogu postići dva cilja – brz početak i brz kraj fermentacije, što predstavlja prednost s obzirom da se u tehnologiji etanola fermentacija izvodi tako da ćelije kvasca započnu fermentaciju brzo. U Alltech-u su patentirali *Super Twin soj<sup>TM</sup>* tj. postupak pomoću dva soja kvasca. Dva soja se upotrebljavaju da se potpomogne brzi start, visoka viabilnost i pupljenje u kasnoj fermentaciji, odnosno pupljenje započinje ranije i nastavlja se duže i tako daje veće mogućnosti za alkoholnu fermentaciju. Prvi soj je soj 1230 suvog kvasca koji prvi počinje pupljenje, a drugi je soj 1226 suvog kvasca koji brže započinje sintezu etanola u toku fermentacije (on podstiče pupljenje pri kraju fermentacije) [4].

Polno razmnožavanje ogleđa se u formiranju askospora koje nastaju u kesičastim organima askusima. Broj askospora u askusu varira od 1-16. Kvasci iz roda *Saccharomyces* imaju 4 askospore u askusima. Postoje haploidni i diploidni kvasci tj. sa polovinom i punim brojem hromozoma. Većina kvasaca koji se koriste u industriji su diploidni. Pre nastajanja askospora dolazi do spajanja kompletnog genetičkog materijala

između dve jedinice različitog pola uz spajanje jedara. Spojena jedra se nakon toga redukciono dele. Do spajanja može doći i posle formiranja spora. [113].

#### 3.3.2.1.5. Kvasci kao producenti bioetanola

Efikasnost iskorišćavanja supstrata i ekonomičnost procesa alkoholne fermentacije značajno zavisi od fizioloških karakteristika korišćenih mikroorganizama. Primenom kvasaca prinos etanola može biti veći i od 90% od teorijskog prinosa, a koncentracija etanola u komini oko 10-12% vol. Na bazi uglavnom laboratorijskih ispitivanja, objavljeni su rezultati selekcije mikroorganizama koji mogu fermentisati šećere do 15% vol. etanola [143], pa čak i 23% vol. [144]. Kvasci su u odnosu na kiseonik fakultativno anaerobni mikroorganizmi. U odnosu na temperaturu pripadaju mezofilnim mikroorganizmima sa optimalnom temperaturom rasta i razvića od 25-45 °C. Da li će kvasac fermentisati neki šećer zavisi od toga da li postoji transportni mehanizam za taj šećer, enzimi potrebni za njegovu razgradnju i kakva je prostorna struktura šećera. Kvasci mogu da fermentišu supstrate sa različitim koncentracijama šećera, obično od 4-16%. Postoje i osmofilni kvasci koji se razvijaju u koncentrovanijim sredinama, a to su predstavnici iz roda *Zygosaccharomyces*: *Z. rouxii* i *Z. melis*. U odnosu na etanol kvasci se normalno razvijaju u sredinama do 10% vol. etanola [113].

Selekcija soja kvasca se vrši prema sledećim osobinama:

- brzini fermentacije
- visokom prinosu etanola po jedinici utrošenog supstrata
- visokoj tolerantnosti na etanol
- malim zahtevima u pogledu nutrijenata
- otpornosti prema višim koncentracijama šećera
- niskom sadržaju isparljivih kiselina [39].

Kao što je već ranije napomenuto, za proizvodnju etanola najznačajniji su kvasci iz porodice *Saccharomycetaceae*, odnosno vrste iz roda *Saccharomyces* i *Schizosaccharomyces*.

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, čiji se sojevi primenjuju u različitim fermentacijama, je poznata kao pivski kvasac „gornjeg vrenja“. Upotrebljava se takođe u

pekarstvu (pekarski kvasac), u proizvodnji vina, rakije itd. Razmnožava se bespolno dupljenjem ili polno pomoću askospora (ima 4 spore u askusu) [113].

Drugi predstavnik je *Saccharomyces carlsbergensis* koji se upotrebljava u pivarstvu kao kvasac „donjeg vrenja“. Ovaj kvasac je dobio ime po pivnici Carlsberg u Kopenhagenu, gde je prvi put izolovan kao čista kultura 1883. godine od strane Dr Emila Christian Hansen-a [113]. Međutim, danas sinonim za ovaj kvasac je *Saccharomyces pastorianus*, koji predstavlja hibrid kvasaca *S. cerevisiae* i *S. bayanus*. [113, 139, 140].

*S. cerevisiae* i *S. pastorianus* su morfološki vrlo slični, ali se razlikuju po fiziološkim karakteristikama. Oba kvasca podjednako brzo previru glukozu i fruktozu, manozu sporije, a za previranje galaktoze je neophodna prethodna indukcija enzima. Od disaharida brzo previru saharozu i maltozu, a od trisaharida maltotriozu, ali znatno sporije. Ne koriste dekstrine, inulin i laktozu. *S. cerevisiae* delimično previre rafinozu i ne koristi melibiozu, za razliku od *S. pastorianus* koji ih potpuno previre. Kada je u podlozi prisutno više vrsta šećera, kvasci ih fermentišu po određenom redosledu. Prvo se koristi saharoza, koja se ekstracelularnim enzimima razgradi do fruktoze i glukoze, zatim se previre maltoza pa maltotriozu. U smeši glukoze i fruktoze znatno brže se razgrađuje glukoza [112]. U tabeli 3.2. je prikazana sposobnost previranja različitih šećera kod kvasaca *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* i *Schizosaccharomyces pombe* [130]. Optimalna temperatura za fermentaciju etanola za *S. cerevisiae* je 28 °C, a za *S. pastorianus* je 25 °C. Optimalna pH vrednost za ova dva kvasca je 4-5, a koncentracija šećera u podlozi od 15-20% [112, 113].

Tabela 3.2. Prikaz šećera koje mogu previrati kvasci *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* i *Sch. pombe* [130]

	Glu	Ga	Sah	Mal	La	Me	Ra	Treh	Cel	Inu	Skrob
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	+,slabo	+/-	-	-	-
<i>S. pastorianus</i>	+	+	+	+	-	+	+,potpuno	+/-	-	-	-
<i>Sch. pombe</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

Glu=glukoza, Ga=galaktoza, Sah=saharozu, Mal=maltoza, La=laktoza, Me=melibioza, Ra=rafinoza, Treh=trehaloza, Cel=celobioza, Inu=inulin

Kvasac *Saccharomyces uvarum* danas se smatra kao sinonim za kvasac *S. bayanus*. Prvi ga izolovao Martin Williem Beijerinck (1898. god.). Takođe predstavlja kvasac „donjeg vrenja“, toleriše i do 18 vol% etanola i morfološki je sličnog izgleda kao *S. cerevisiae* [113, 139, 140].

Od vinskih kvasaca poznata vrsta koja se koristi za dobijanje etanola je i *S. ellipsoideus* koji ulazi u sastav epifitne mikroflore grožđa. M. Reess je prvi identifikovao i dao ime kvascu *S. ellipsoideus* kao kvasac koji previre voćne sokove. Enolozi, 1975. godine, definišu ovaj kvasac kao striktni vinski kvasac, čiji je sinonim *S. vini* [136]. Danas se smatra kao varijetet kvasca *S. cerevisiae* (odnosno *S. cerevisiae* var. *ellipsodeus*) [138, 140]. Ovaj kvasac ima ćelije ovalnog, elipsoidnog obilka, i podnosi visoke koncentracije etanola (do 14% vol.) [113].

U prirodi je veoma raširena vrsta *Kloeckera apiculata* koja je deo epifitne mikroflore voća i čini 70% svih kvasaca u prirodi. Ćelije su kruškastog i limunastog oblika. Veoma se brzo razmnožava i zbog toga na početku spontane fermentacije ima glavnu ulogu, stvara 3-4% vol. etanola i onemogućuje razvoj bakterija i plesni. Međutim, ovaj kvasac je slabo otporan na etanol, relativno brzo zaustavlja aktivnost i ustupa mesto kvascima otpornijim na etanol (*S. ellipsoideus*). Maksimalno proizvodi 5-6% vol. etanola [113].

Za proizvodnju etanola mogu se koristiti i kvasci iz roda *Schizosaccharomyces*, naročito u toplijim krajevima. Njihova optimalna temperatura rasta je 37 °C, a ćelije su cilindričnog ili sferičnog oblika. Vrsta *Schizosaccharomyces pombe* je izdvojena iz afričkog piva koje se proizvodi iz prosa. Njegovi sojevi se koriste u Meksiku i Argentini za dobijanje špiritusa na temperaturama od 32 do 42 °C. U našim krajevima se koristi za dobijanje žestokih alkoholnih pića (jabukovače) [113].

Primena mezofilnih kvasaca u regionima sa visokim prosečnim temperaturama u toku godine je nerentabilna zbog visokih spoljnih temperatura i ulaganja velike količine energije da bi se održala temperatura između 25 i 30 °C. U takvom podneblju primenu su našli termotolerantni kvasci iz roda *Kluyveromyces*. Vrsta *Kluyveromyces marxianus* proizvodi etanol na temperaturi iznad 40 °C, a maksimalna temperatura rasta je u opsegu od 49-52 °C [109, 145]. Prinos etanola, tolerantnost na pH i osmotski pritisak su slični kao kod *S. cerevisiae*, a tolerantnost na etanol niža [146]. Termotolerantni kvasci se uspešno mogu primeniti u postupku simultane saharifikacija i fermentacije jer viša temperatura

dozvoljava bržu i efikasniju enzimsku hidrolizu supstrata [109]. Prednosti korišćenja termofilnih mikroorganizama u proizvodnji etanola su sledeće:

- na visokim temperaturama koje su optimalne za njihov rast skraćuje se vreme trajanja fermentacije, i ostvaruje se veća efikasnost fermentacije
- viskozitet fermentacionih podloga se smanjuje sa povećanjem temperature, pa je potrebno uložiti manje energije za mešanje
- smanjena je potreba za ulaganjem energije da bi se održao proces na željenoj temperaturi
- nisu neophodni sterilni uslovi procesa
- rastvorljivost kiseonika i drugih gasova u fermentacionoj tečnosti se smanjuje sa povećanjem temperature što omogućava dugotrajno održavanje anaerobnih uslova [4].

Pod anaerobnim uslovima neke vrste nižih i viših plesni mogu da izazovu alkoholnu fermentaciju kao što su: *Mucor rouxii*, *Mucor orysae* i *Rhizopus* sp., kao i vrste iz roda *Aspergillus*. Ovi mikroorganizmi u anaerobnim uslovima podsećaju na prave kvasce. Mogu da fermentišu šećere dajući do 5% vol. etanola. Njihovi predstavnici su se ranije koristili za saharifikaciju polisaharida pre upotrebe pravih kvasaca. U Kini i Japanu se koriste za spremanje slabih alkoholnih pića [113].

### 3.3.2.2. Bakterije

U proizvodnji etanola pored kvasaca mogu se koristiti i određene vrste bakterija koje imaju primenu u proizvodnji slabih alkoholnih pića u tropskim krajevima i pripadaju tzv. šećernim bakterijama – *Saccharomonas*. U slatkom soku agavinog lista i u palminom soku otkrivena je bakterija *Pseudomonas lindneri* [113].

U proizvodnji etanola iz lignoceluloznih sirovina veoma se uspešno primenjuje gram (-) bakterija *Zymomonas mobilis*, koja može tolerisati sadržaj etanola do 120 g/l. U odnosu na vrste iz roda *Saccharomyces* daje veći prinos etanola (za 5-10% više etanola po jedinici glukoze) i do 2,5 puta veću specifičnu produktivnost etanola. To je posledica fiziologije bakterije, jer ona metaboliše glukozu putem Entner-Doudoroff-ovog puta (ED puta) u anaerobnim uslovima, u odnosu na EMP put (glikolizu) kod kvasaca. Bakterija *Zymomonas* proizvodi manje biomase i sporednih proizvoda (kao što su glicerol, ćilibarna

kiselina, acetoin, butandiol i sirćetna kiselina) nego kvasac. Ova bakterija takođe ima male zahteve za nutrijentima. Međutim, i pored navednih prednosti, nedostaci *Z. mobilis* su što fermentiše samo glukozu, fruktozu i saharozu (ali ne i ksilozu i arabinozu koje nastaju pri razgradnji pentoza) i potrebna je sterilizacija podloge što povećava troškove proizvodnje [110].

Iako ova bakterija daje visoke prinose u proizvodnji etanola i iz skrobnih sirovina, svi komercijalni proizvođači vrše fermentaciju pomoću kvasaca. Dalji razvoj upotrebe ove bakterije bi se odnosio na povećanje tolerantnosti na inhibitore (*Z. mobilis* je manje tolerantan na sirćetnu kiselinu), redukciju upotrebe faktora rasta, poboljšanje produktivnosti etanola, mogućnosti bakterija da proizvode etanol u većim bioreaktorima, i dobijanje takvih sojeva bakterija koji imaju kvalitativne prednosti u poređenju sa kvascima (kao što je redukovana potreba za celulazama) [110].

Još jedna gram (-) bakterija pogodna za prevođenje celuloze u etanol je *Klebsiella oxytoca*. Ova bakterija raste na  $\text{pH} \approx 5$  i temperaturi od  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , a od šećera koristi i heksoze i pentoze (kao i celobioze i celotrioze). Fermentiše glukozu do raznih organskih kiselina i drugih neutralnih proizvoda. U poređenju sa *Z. mobilis* može fermentisati veći broj supstrata. Etanol se formira preko PFL (piruvat formiat-liaze) puta, u anerobnim uslovima, pri čemu se pored etanola formiraju formiati i acetati. Prvi enzim u ovom procesu prevodi piruvat u formiat i acetyl-CoA koji se kasnije metaboliše do acetata ili etanola. PFL put je neaktivan u prisutstvu kiseonika i pri niskim pH vrednostima [110].

Primenom termofilnih bakterija u proizvodnji etanola dobijeni su dobri rezultati sa *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Optimalna temperatura rasta ove bakterije je  $69\text{ }^\circ\text{C}$ . Prednosti u odnosu na druge proizvodne mikroorganizme su: širok pH optimum (5,5 do 8,5) i sposobnost da koristi veliki broj supstrata uključujući skrob, celobiozu, laktozu i razne pentoze [4].

Pored klasičnih metoda koje se primenjuju za dobijanje efikasnijeg proizvodnog mikroorganizma danas se koriste metode genetičkog inženjerstva. Vezano za proizvodnju bioetanola na skrobnim hidrolizatima značajni su pravci dobijanja mikroorganizama koji istovremeno imaju i ošećeravajuću i fermentativnu aktivnost [147], ili čak kombinovanu likvefakcionu, ošećeravajuću i fermentativnu [148]. Međutim, jedan od osnovnih nedostataka primene genetički modifikovanih mikroorganizama je njihova nedovoljna stabilnost. Naime, tokom vremena u procesu može doći do njihove reverzije (gubitka

ubačenih gena), gubitka željenih osobina, genetički manipulirani mikroorganizmi sporije rastu, a i sam proces zahteva veće mere bezbednosti da ne bi došlo do oslobađanja ovih mikroorganizama u okolinu [4].

Formiranje soja *Escherichia coli*, gram (-) bakterije, koja selektivno proizvodi etanol iz celuloznih sirovina, je prva uspešna primena metaboličkog inženjerstva. *Escherichia coli* ima nekoliko prednosti: sposobnost da fermentiše širok spektar šećera, ne zahteva kompleksne faktore rasta i ima primarnu industrijsku primenu (npr. za proizvodnju rekombinantnih proteina). Nedostaci su neutralna pH vrednost na kojoj raste (pH=6-8) i manja izdržljivost kulture u poređenju sa kvascem. *Escherichia coli* fermentiše šećere do etanola i organskih kiselina. Etanol se dobija iz piruvata preko PFL puta [110].

### 3.3.3. Alkoholna fermentacija sa imobilisanim mikroorganizmima

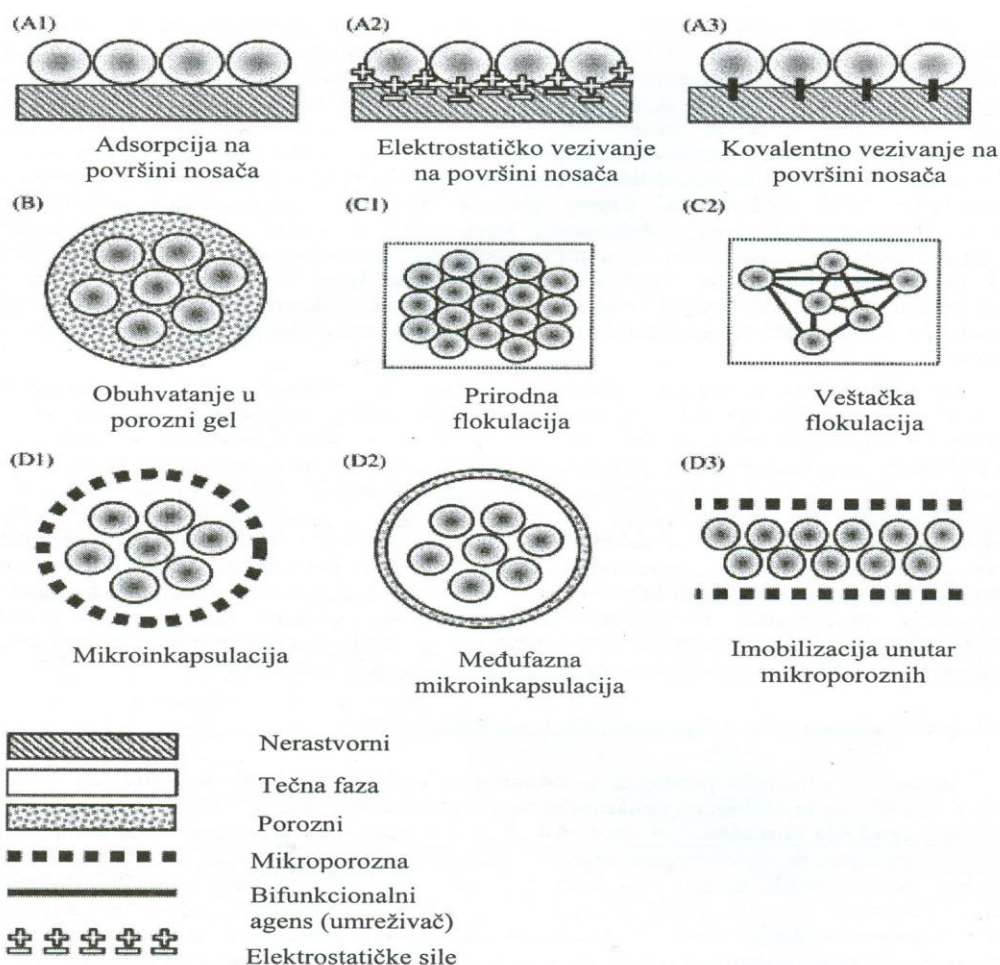
Alkoholna fermentacija se može izvršiti pomoću slobodnih ili imobilisanih ćelija mikroorganizama. Poslednjih godina veliku pažnju su upravo privukli imobilisani ćelijski sistemi zbog brojnih prednosti koje poseduju. Imobilizacija predstavlja postupak kojim ćelije mikroorganizama, fizičkim ili hemijskim putem, bivaju pričvršćene za površinu ili smeštene unutar strukture određenog nosača, pri čemu ne dolazi do gubitka njihove viabilnosti i katalitičke aktivnosti [96]. Primenom ovog postupka moguće je ostvariti visoku koncentraciju katalitički aktivne biomase u određenom delu prostora što dovodi do visoke produktivnosti reaktora, poboljšanja stabilnosti procesa i dobijanja krajnjeg proizvoda uniformnog kvaliteta. Osnovne prednosti primene imobilisanih ćelijskih sistema u proizvodnji etanola su:

- mogućnost postizanja visoke koncentracije aktivnih ćelija unutar bioreaktora, što vodi ka povećanju volumetrijske produktivnosti, skraćanju vremena fermentacije i eliminaciji neproduktivnih faza ćelijskog rasta
- povećanje stabilnosti i viabilnosti ćelija mikroorganizama,
- povećanje iskorišćenja supstrata i prinosa etanola
- mogućnost izvođenja kontinualnih fermentacija sa velikim brzinama razređenja bez rizika da dođe do ispiranja ćelija,



- povećanje tolerantnosti imobilisanih ćelija prema visokim koncentracijama supstrata, i smanjenje inhibicije proizvodom ili supstratom
- nosači koji se koriste u postupku imobilizacije imaju zaštitnu ulogu pri fizičko-hemijskim uticajima pH, temperature, rastvarača i teških metala na ćelije mikroorganizama
- mogućnost regeneracije i ponovnog korišćenja imobilisanih ćelija mikroorganizama
- mogućnost izvođenja istovremene saharifikacije i fermentacije primenom koimobilisanih ćelijskih sistema [7, 149, 150].

Razvijene i primenjene metode imobilizacije ćelija su slične kao kod imobilizacije enzima i prikazane su na slici 3.13. [4]. Praktičnu primenu u fermentacionim procesima u najvećoj meri imaju metod smeštanja ćelija unutar matrice gela i adsorpcija ćelija. Imobilizacija postupkom smeštanja ćelija u matricu gela se izvodi mešanjem suspenzije ćelija sa rastvorom polimera i njihovim dispergovanjem (ukapavanjem/ekstruzijom ili emulgovanjem) u vidu kapljica u odgovarajući medijum gde se podvrgavaju procesu očvršćavanja. Na ovaj način se dobijaju gel-čestice sfernog oblika u se čijoj matrici nalaze imobilisane ćelije. Ovaj postupak imobilizacije je danas najšire rasprostranjen kako zbog same jednostavnosti izvođenja imobilizacije u blagim uslovima (za same ćelije), tako i zbog toga što je moguće postići visoku koncentraciju aktivnih ćelija po jedinici mase nosača [149]. Najčešće korišćeni nosači pri ovom postupku imobilizacije su nosači polisaharidne prirode, kao što su Ca-alginat, karagenan, agar, pektin, zatim nosači proteinske prirode (kolagen, želatin), epoksi smole i neki sintetski polimeri (polivinilalkohol). U poslednje vreme dobri rezultati se dobijaju primenom strugotine drveta, mineralnih materija vulkanskog porekla (kisiris), narandžine kore i epoksi smola kao nosača za imobilizaciju. Ca-alginat je najčešće korišćeni nosač za imobilizaciju ćelija. Ovaj nosač je ispoljava zadovoljavajuću stabilnost pri dužem korišćenju u toku kontinualnih fermentacija, a kvasac imobilisan u alginatu obezbeđuje visoke prinose etanola [109, 149-155].



Slika 3.13. Šematski prikaz različitih metoda imobilizacije: A) imobilizacija na površini čvrstih nosača, B) obuhvatanje unutar poroznog matriksa-gela, C) flokulacija (agregacija) ćelija, D) mikroinkapsulacija [4]

Imobilizacija može uticati na rast, fiziologiju i metaboličku aktivnost ćelija mikroorganizama. Za ove promene u imobilisanim ćelijama odgovorni su sledeći parametri: ograničenje prenosa mase difuzijom, promene u morfologiji ćelije, uticaj osmotskog pritiska, uticaj na permeabilnost ćelijske membrane i dostupnost osnovnih hranljivih materija [150]. Prasad [156] je pored već poznatih prednosti imobilizacije, ukazao i na određene nedostatke. U nekim slučajevima efikasnost imobilisanih ćelija može biti znatno smanjena u odnosu na sisteme sa suspendovanim slobodnim ćelijama mikroorganizama usled ograničenja koja postoje kod difuzije substrata u gel-česticu, pa ćelije koje se nalaze duboko u matriksu postaju neaktivne. S druge strane, zbog difuzionih

ograničenja može doći i do akumulacije proizvoda (etanola) u matriksu i do pojave inhibicije proizvodom. Takođe, alginat i polisaharidni hidrogelovi nisu se pokazali kao odgovarajući nosači u proizvodnji alkohola na industrijskom nivou zbog njihove visoke cene i niske hemijske i mehaničke stabilnosti [150].

### 3.3.4. Metode izvođenja fermentacije u proizvodnji bioetanola

Alkoholna fermentacija u proizvodnji etanola se može izvoditi na četiri načina: diskontinualno, kontinualno, dolivno i semikontinualno. Najčešće se primenjuju diskontinualne i kontinualne metode fermentacije. Prilikom razmatranja primene određenog sistema uzimaju se u obzir osobine sirovine koja će se koristiti, troškovi ulaganja, kao i cene opreme i sirovina. Proces koji se zahteva u industriji je onaj koji zahteva minimum ulaganja za opremu uz maksimalne količine proizvoda [4].

*Diskontinualni postupak* je veoma poznat postupak i podrazumeva prevođenje supstrata tokom 36-48 h u etanol sa prinosom od 90 do 95% od teorijskog prinosa etanola, i sa krajnjom koncentracijom etanola od 10 do 16% vol. Nakon završene fermentacije fermentisana podloga se pumpom prebacuje u prihvatni sud iz koga se napajaju destilacione kolone. Nakon pražnjenja sledi pranje i sterilizacija fermentora, i priprema za novu fermentaciju. Ovaj postupak ima sledeće prednosti: niske investicije; ne zahteva mnogo kontrole; mali zahtevi za kompletnu sterilizaciju; ne zahteva naporan rad; mali rizik od finansijskih gubitaka; lako vođenje procesa; velika fleksibilnost se postiže upotrebom fermentora za razne specifičnosti proizvoda; dobro definisano vreme trajanja fermentacije, tako da se mogu ostvariti visoki nivoi konverzije; nizak rizik od infekcije i mutacije ćelija, kad se koristi relativno kratko vreme fermentacije. Međutim, postoje i nedostaci ovih sistema kao što su: neproduktivno vreme za pražnjenje, pranje, sterilizaciju, hlađenje, zagrevanje i ponovno postavljanje fermentora (fermentor je iskorišćen samo 80%); česte sterilizacije mogu da dovedu do oscilovanja u mernim instrumentima; češće pripremanje inokuluma i kontrola ovog nestacionarnog procesa zahteva više tokova; veći rizik za osoblje od mogućeg kontakta sa patogenim mikroorganizmima ili toksičnim produktima; inicijalna lag faza smanjuje produktivnost fermentora. Pored ovih nedostataka diskontinualni način vođenja fermentacije preporučuje se u fabrikama malog kapaciteta;

jedan fermentor je dovoljan da se proizvede veći broj proizvoda. Efikasnost diskontinualne fermentacije može se povećati uvođenjem recirkulacije ćelija kvasca ("Melle Boinot postupak").

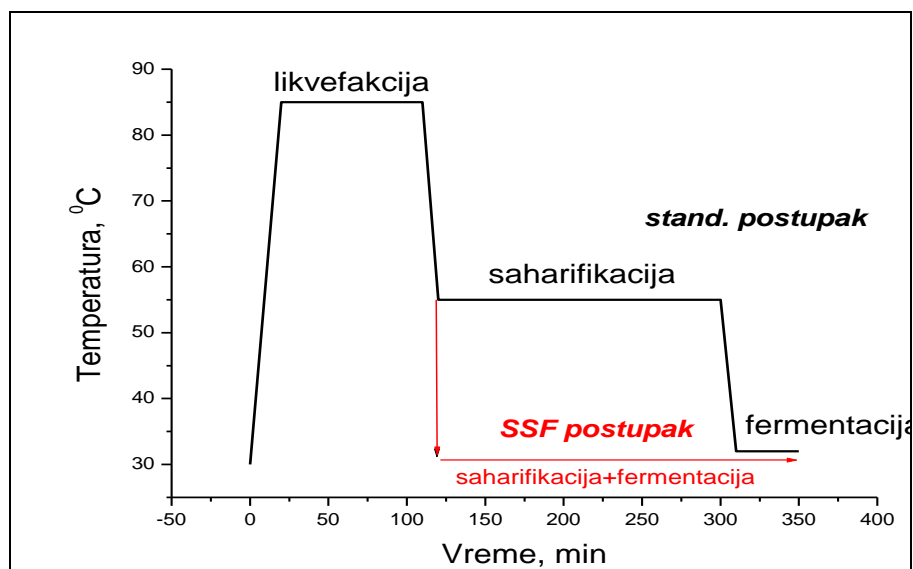
**Dolivni postupak** (fed-batch) može se smatrati kao kombinacija diskontinualnog i kontinualnog postupka i veoma je popularan u proizvodnji etanola. Hranljiva podloga se dozira tako da se koncentracija izvora ugljenika održava konstantnom, i na taj način se inhibicija substratom održava na minimumu. Substrat se dodaje onom brzinom kojom se troši, a proces traje dok se ne dostignu limitirajuće koncentracije etanola ili se ne utroši neki esencijalni nutrijent. Prednosti ove fermentacije su: postizanje visokih prinosa u dobro definisanom vremenu kultivacije (tokom fermentacije ne dodaju se niti odvođe ćelije proizvodnog mikroorganizma); visok nivo fleksibilnosti; smanjene su mogućnosti za mutaciju proizvodnog mikroorganizma, i rizik od infekcije; moguća je optimizacija uslova rasta, produkcionne faze kao i starosti ćelija. Nedostaci dolivnog postupka fermentacije su sledeće: neproduktivno vreme punjenja, zagrevanja, sterilizacije, hlađenja, pražnjenja i pranja fermentora; viši zahtevi za radnu snagu, ili skupi instrumenti kao što je kompjutersko vođenje (na primer, održavanje koncentracije sustrata zahteva skupe instrumente); veće mogućnosti rizika za radnike od kontakta sa patogenim mikroorganizmima ili toksičnim produktima; i više habanja i trošenja instrumenata od česte sterilizacije.

**Semikontinualni** postupak obuhvata takozvane ulazno-izlazne, protočne procese i varijacije cikličnih fermentacija. U ovom procesu se jedan deo sadržaja fermentora, sa proizvodnim mikroorganizmom izvodi iz fermentora i dodaje ista zapremina sveže podloge. Ovaj tip fermentacije se može izvoditi sa nekoliko fermentora. Prednosti ovog postupka fermentacije su: nije potreban sud za inokulum, sem na početku rada; ne gubi se vreme za neproduktivne operacije pranje i ponovnu sterilizaciju; visoka fleksibilnost, malo habanja i oštećenja instrumenata od sterilizacije; ne treba mnogo kontrole. Primenom ovog sistema, vreme fermentacije se smanjuje zbog visoke koncentracije i aktivnosti ćelija kvasca. Međutim, ima i nekoliko nedostataka: povećanje investicija zbog veće zapremine fermentora; visok rizik od kontaminacije i mutacija zbog dugog procesa kultivacije i na kraju procesa se dobija zajedno biomasa i produkt. I pored navedenih nedostataka semikontinualan proces se često primenjuje u industrijskoj proizvodnji etanola.

**Kontinualni postupak** je tehnološki najinteresatniji zbog toga što se proizvodni mikroorganizam nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta tako da sve vreme produktivnost etanola raste. Prednosti ovog postupka su sledeće: mehanizacija i automatizacija su maksimalno omogućene; zahteva malo radne snage; zahteva manje zapremine fermentora zbog toga što nema neproduktivnog vremena; konstantni kvalitet produkta; male su mogućnosti kontakta sa patogenim mikroorganizmima i toksičnim materijalima zbog toga što je poboljšana mehanizacija; manje se troše i oštećuju instrumenti procesom sterilizacije [4].

Pored izabranog postupka fermentacije, od izuzetnog značaja za efikasnost fermentacije i produktivnost proizvodnje etanola mogu biti određena konstrukciona poboljšanja fermentora radi boljeg prenosa mase i toplote u sistemu, kao i bolje kontrole procesa [157]. Da bi se izbegla inhibicija mikroorganizama visokom koncentracijom etanola ispituje se spajanje procesa fermentacije i separacionih tehnika (fermentori združeni sa membranskim postupkom izdvajanja; uvodjenje tehnika uklanjanja etanola vakuumom) [2]. Iako je ekonomičnost ovih poslednje navedenih tehnika diskutabilna ona se mora potvrditi na svakoj pojedinačnoj procesnoj koncepciji. Zduživanje faze saharifikacije i fermentacije skrobnih sirovina, odnosno **SSF** proces (simultana saharifikacija i fermentacija) vodi ka poboljšanju ukupne ekonomike procesa, i sa aspekta potrošnje energije, i sa aspekta ukupne dužine trajanja procesa. Naime, SSF proces nam pruža mogućnost smanjenja potrošnje energije jer se uspešno može izvoditi na 30 °C, što je znatno manja temperatura od temperature saharifikacije (50 °C). Zbog spajanja faza saharifikacije i fermentacije moguće je smanjenje ukupne dužine trajanja procesa za oko 4 h, odnosno za vreme potrebno za saharifikaciju. Primenom ovog procesa smanjuju se ukupni troškovi procesa, postiže veća efikasnost proizvodnje i veći prinos etanola. Pored navednih prednosti, primena SSF postupka nam omogućava sledeće pogodnosti: proces se odvija u jednom biorekatoru, mikroorganizmi odmah koriste dobijene šećere, zajedničko prisustvo mikroorganizama i šećera smanjuju akumulaciju šećera i ograničeni troškovi investiranja. Međutim, nedostaci korišćenja ovog procesa su: različiti temperaturni optimumi reakcije saharifikacije i fermentacije, upotreba termotolerantnih mikroorganizama, neophodne genetičke manipulacije nad mikroorganizama koje omogućavaju direktnu fermentaciju šećera u etanol i teškoće u recirkulaciji i ponovnoj

upotrebi mikroorganizama. Na slici 3.14. prikazan je temperaturni profil SSF procesa [158, 159].



Slika 3.14. Temperaturni profil SSF procesa

Kod pogona za proizvodnju bioetanolu većih razmera potrebna je i veća količina kvasca, odnosno proizvodnog mikroorganizma da bi se izvela energična fermentacija. U takvom postupku se može uvesti i aerobna faza propagacije kvasca koja prethodi fermentaciji. Racionalizacijom postupka, radi bolje efikasnosti moguće je istovremeno odvijati fazu ošćerenja, umnožavanja kvasca i fermentacije – *SSPF* proces (simultana saharifikacija, propagacija i fermentacija) [4].

### 3.4. IZDVAJANJE PROIZVODA

Osnovni proces kojim se etanol izdvaja iz podloge nakon završene fermentacije je *destilacija* i *rektifikacija*. Klasičnim postupcima destilacije i rektifikacije postiže se koncentracija etanola od oko 96% vol., što je neprihvatljiv kvalitet etanola ukoliko bi se

koristio kao gorivo. Za dobijanje bioetanola koji se sam ili u smeši sa benzinom koristi kao motorno gorivo potrebno je izdvojiti vodu i određen sadržaj nečistoća [2, 4].

U američkoj i evropskoj literaturi opisane su dve kategorije motornog goriva na bazi bioetanola: anhidrovan i neanhidrovan. Neanhidrovani etanol sadrži 85-95% vol. etanola i namenjen je za pogon motora koji koriste čist bioetanol (a ne smeše sa benzinom). Ova kategorija se, pored anhidrovanog etanola, koristi u Brazilu. Anhidrovan etanol je namenjen za namešavanje sa benzinom i ima minimalno 99,5% čistoću. Prema današnjim standardima, prevladava mišljenje da se za gorivo može koristiti samo anhidrovani etanol sa najmanjom čistoćom od 99%. Propisi koji važe u Srbiji vezano za kvalitet etanola za namešavanje sa benzinom su relativno strogi i pretpostavljaju minimalan sadržaj od 99,6% vol. etanola [4,37].

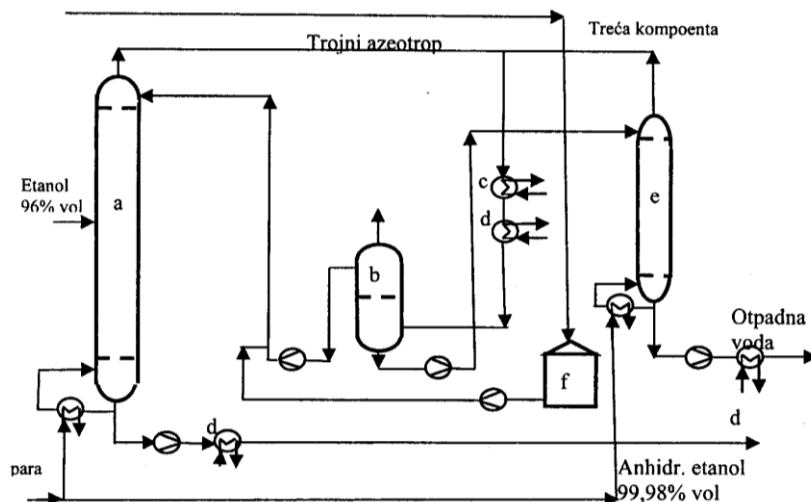
Postoje dva osnovna tipa tehnoloških postupaka za dobijanje anhidrovanog bioetanola:

1. *Azeotropska destilacija i rektifikacija*

2. *Nedestilacione metode:*

- dehidratacija adsorpcijom
- dehidratacija korišćenjem membranske tehnologije (pervaporacija)

**Azeotropska destilacija** je prvobitno namenjena za dobijanje čistog, apsolutnog etanola (99,98% vol), sa sadržajem vode od <200 mg/kg i <20 mg/kg ukupnih nečistoća. Šema postrojenja za azeotropnu destilaciju je prikazana na slici 3.15. [4]. Rafinisani etanol (95-96% vol) koji sadrži etanol i vodu se meša sa trećom komponentom tzv. „entreinerom“ (benzen, heptan ili cikloheksan) i tako stvara azeotropnu smešu kojom se napaja dehidrataciona kolona. Frakcija anhidrovanog etanola se sakuplja na dnu dehidratacione kolone i hladi pre skladištenja. Tercijarni azeotrop napušta kolonu na vrhu, kondenzuje se i zatim razdvaja na organsku fazu i vodu u dekanteru. Efikasan sistem za dehidrataciju etanola ima potrošnju od 1-1,5 kg pare po litri anhidrovanog etanola. Postrojenje za dobijanje anhidrovanog etanola je često u savremenim sistemima sastavni deo sistema za destilaciju i rektifikaciju. U tom slučaju nije potrebno ugrađivati posebnu kolonu za koncentrovanje etanola jer tu funkciju može da vrši rektifikaciona kolona [4].



Slika 3.15. Postupak dobijanja anhidrovanog etanola azeotropskom destilacijom: a) dehidrataciona kolona, b) dekanter, c) kondenzator, d) hladnjak, e) kolona za ispiranje ugljovodonika, f) treća komponenta [4]

Procesi destilacije i rektifikacije i daljeg prečišćavanja etanola su ekonomski najnepovoljnije faze u proizvodnji etanola. Zbog toga je značajno da profermentisana podloga koja odlazi na destilaciju ima što je moguće veću koncentraciju etanola. U industrijskoj praksi najčešće se destilacija i rektifikacija izvode u zajedničkom postrojenju kontinualnim tokom. Razvoj destilaciono-rektifikacionih sistema koji je baziran na savremenoj konstrukciji i povezivanju destilacionih kolona, racionalizaciji energije rekuperacijom, kondenzacijom i kompresijom nastalih para, uvođenju termo-pumpi i savršenijeg kontrolnog sistema omogućava i do 40% energetske uštede u odnosu na potrošnju energije koja u konvencionalnim destilaciono-rektifikacionim postrojenjima iznosi 10-12 MJ/l anhidrovanog etanola [160]. U proizvodnji etanola iz žitarica, značajna ušteda energije (za oko 10%) se postiže recirkulacijom toplote iz sistema za zagrevanje skrobne sirovine iz faze pripreme supstrata u fazu destilacije i rektifikacije [157].

**Dehidratacija adsorpcijom** se zasniva na korišćenju dehidratacionih sredstava za izdvajanje vode iz rafinisanog etanola (95-96% vol). Najčešće se za ove svrhe koriste molekulska sita čije su pore permeabilne za vodu, ali ne i za etanol [75, 161]. Uspešno se koriste molekulska sita sa veličinom pora od 3 Å (angstrom; 1 Å=10<sup>-10</sup> m), kroz čije pore difunduju molekuli vode prečnika 2,8 Å, dok molekuli etanola prečnika 4,4 Å ne mogu da

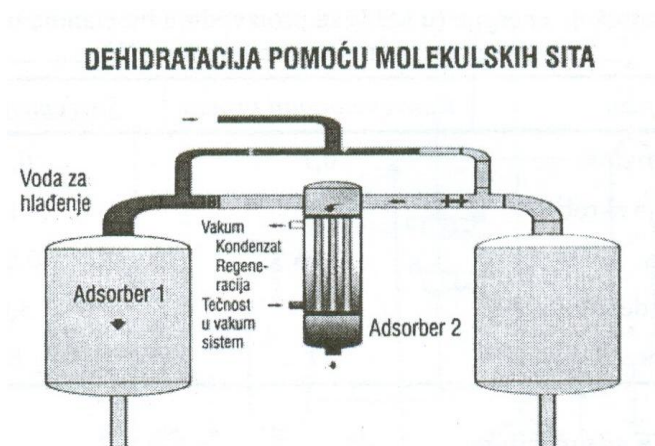


difunduju [161]. Molekulska sita mogu biti sintetički ili prirodni zeoliti, kalijum-aluminosilikatnog sastava ili određeni polimerni materijali [162]. Prvi put su uvedena u industriju etanola 1970-tih godina. Šema jednog tipičnog postrojenja za dehidraciju pomoću molekulskih sita prikazana je na slici 3.16. [75]. U prvim projektima korišćena je separacija u tečnoj fazi, čija je prednost eliminacija opasnih rastvarača i smanjena kompleksnost destilacije. Međutim, krajem 80-tih godina XX veka uveden je postupak sa molekulskim sitima u parnoj fazi, eliminišući tako ograničenja u kapacitetu koja postoje kod sistema u tečnoj fazi. Kod jednog tipičnog dehidratora na bazi molekulskih sita etanol na ulazu sadrži oko 5-20% vode, a na izlazu oko 0,25-20 ppm vode, sa vremenom zadržavanja 3-10 min [4]. Sistem za dehidraciju etanola na bazi molekulskih sita primenjuje se i u našoj zemlji od 1997. god. u Fabrici lekova Zorka-Pharma u Šapcu, i sličan je postupku prikazanom na slici 3.16. Izvodi se u uređaju sa dve adsorpcione kolone napunjene molekulskim sitima tipa 3A, koje su naizmenično u ciklusu adsorpcije/desorpcije, čime je obezbeđena kontinualnost rada. Ovim postupkom dobija se tzv. "apsolutni etanol", pre svega za farmaceutske namene. Kapacitet linije za proizvodnju je 50.000 lit/god. Postupak je zaštićen patentom YU 49264 BS/Glasnik intelektualne svojine 2004/6 C [161].

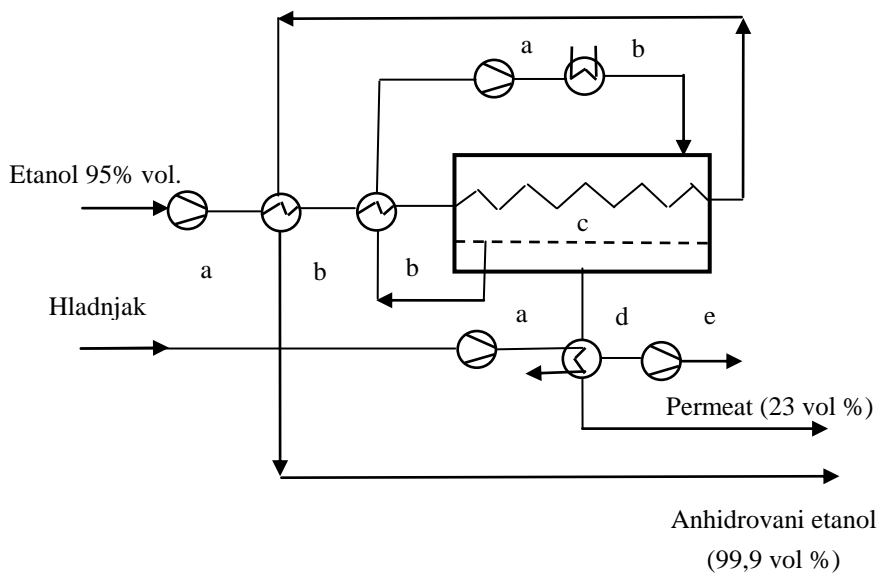
Pored molekulskih sita i drugi čvrsti adsorbenti se mogu primenjivati za adsorpciju vode iz 96% vol. etanola. Od adsorbenata pogodni su celuloza i skrob zbog malog toplotnog efekta adsorpcije [163]. Separaciju smeše etanol-voda prevođenjem pare preko celuloznih ili skrobnih adsorbenata prvu put su izveli Ladisch i Dyck 1979. godine. Od tada, brojne studije su pokazale da se u ove svrhe mogu koristiti razni materijali kao što su npr. kukuruzno brašno, pšenična zrna itd., čije su prednosti mala cena, mogućnost ponovnog korišćenja za fermentaciju ili za stočnu ishranu, netoksičnost i biorazgradljivost. Pokazalo se da se kukuruzno brašno može 20 puta reciklirati pre nego što se koristi kao stočna hrana [162, 163].

***Dehidracija pervaporacijom*** predstavlja tehnologiju za anhidrovanje etanola koja je novijeg datuma i šematski je prikazana na slici 3.17. [162]. Pervaporator se sastoji od više modula semipermeabilnih membrana na bazi polimera poliviniletanola. Etanol (95% vol.) koji je potrebno anhidrovati se prvo zagreje do 60 °C, a zatim uvodi u membranski modul pervaporatora. Izdvajanje vode u pervaporatoru se vrši pomoću vakuuma manjeg od 1 kPa. Ukupna energija koja se potroši u procesu predstavlja sumu entalpija isparavanja i

kondenzacije. U izdvojenoj vodi zaostaje oko 23% etanola koji se može reciklirati do faze destilacije i rektifikacije i na taj način izdvojiti. Da bi se proizvelo 1.000 l anhidrovanog etanola potrebno je utrošiti oko 135 kg pare (200 kPa), 10 m<sup>3</sup> vode za hlađenje (20 °C) i 15 kWh električne energije. Za separaciju tečnih smeša pervaporacijom veliki značaj imaju zeolitske membrane, koje se nanose na neorganske nosače čija priroda i struktura utiču na membrane. Najčešće se kao nosač koristi sinterovani Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [4].



Slika 3.16. Sistem sa molekulskim sitima za dehidraciju etanola [75]



Slika 3.17. Dobijanje anhidrovanog etanola pervaporacijom: a) pumpa; b) grejač; c) pervaporator; d) kondenzator; e) vakuum pumpa [162]

### 3.5. SPOREDNI PROIZVODI U PROIZVODNJI BIOETANOLA

Da bi proces proizvodnje etanola bio ekonomičan i zadovoljio zahteve vezane za zaštitu životne sredine, nužan preduslov je kompletno iskorišćavanje sporednih proizvoda. Prilikom razmatranja ekonomičnosti proizvodnje etanola na skrobnim sirovinama važno je uzeti u obzir količinu nastalih sporednih proizvoda i njihovu tržišnu valorizaciju. Vrsta i kvalitet sporednih i otpadnih proizvoda iz industrije etanola zavise od vrste sirovine i načina njene pripreme, tehnološkog postupka proizvodnje i naknadne obrade otpadnih proizvoda. Osnovni sporedni proizvodi u proizvodnji etanola iz ugljenohidratnih sirovina su džibra i ugljendioksid.

U klasičnom postupku proizvodnje etanola, *džibra* (sa 15% suve materije) sa dna destilacione kolone se odvodi u taložnik u kome se vrši njena prerada. Oko 83% vode iz taloga se ukloni centrifugiranjem, i dobija se vlažni talog sa oko 37% suve materije. Tečni deo džibre koji je odvojen centrifugiranjem se prihvata i ponovo vraća u proces ukomljavanja sirovine. Talog se odvodi u uparivač u kome se dalje koncentriše. Koncentrisani talog (sa oko 35% suve materije) se meša sa viškom tečne džibre i odvodi na rotacionu tunelsku sušilicu. Masa se suši sve dok sadržaj vlage ne bude ispod 10%. Dobijeni proizvod je suva džibra. Pare koje izlaze iz evaporatora se skupljaju i hlade, i zatim koriste za namakanje zrna u početnoj fazi prerade sirovine. Tokom proizvodnje etanola iz kukuruza u postupku suvog mlevenja, na 1.000 kg utrošenog kukuruza sa 12% vlage i 65% skroba (računatog na suhu materiju) nastaje 229 kg *džibre* sa 90% suve materije i 293 kg etanola (slika 3.3.). Ako se kukuruz melje mokrim postupkom kao sporedni proizvodi dobijaju se: glutensko brašno, gluten za stočnu hranu i kukuruzno ulje iz klice (slika 3.2.) [4].

U sastavu džibre nalaze se sve komponente sirovine osim ugljeni hidrati, kvasac i novonastali međuproizvodi faze razvarivanja, ošecerenja i fermentacije, koje kvasac ne može da metaboliše do etanola [4]. Prema ispitivanjima Belyea i saradnika [164] prosečan hemijski sastav suve kukuruzne džibre je sledeći (g/100 g suve materije): masti 11,9; proteini 31,3; sirova vlakna 10,2; vlakna rastvorljiva u kiselini 17,2; pepeo 4,6 i skrob 5,1.

Primena džibre je raznovrsna, može se koristiti za ishranu stoke, kao đubrivo, kao mikrobiološka podloga, ili kao zamena dela tehnološke vode u procesu ukomljavanja sirovina [165]. Na tržištu se mogu naći sveža i suva džibra. Sveža džibra (sa oko 7-10% suve materije) se može koristiti za stočnu hranu na farmama u neposrednoj blizini fabrike etanola jer je podložna kvarenju, dok se osušena džibra može koristiti tokom cele godine. Na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu ispitivana je mogućnost vraćanja bistre džibre u proces ukomljavanja tokom proizvodnje etanola iz kukuruza čime se značajno povećao prinos etanola (sa dodatkom 30% džibre dostigao se prinos čak od 100%, dok je u kontrolnom uzorku postignut prinos od 97,96% u odnosu na teorijski prinos). Naime, dodatkom džibre dodaju se i amino kiseline i proizvodi razgradnje ćelija kvasca što omogućava ovako visok prinos etanola [4]. Smatra se da je danas svetska potrošnja suve džibre dobijene iz kukuruza i ječma oko 800.000 tona [166].

Tokom fermentacije pored etanola nastaje i **ugljendioksid** kao drugi značajan sporedni proizvod. Na temperaturi od 30 °C i pri atmosferskom pritisku, 1 kg CO<sub>2</sub> ima zapreminu od 0,564 m<sup>3</sup>. Kritična temperatura za komprimovanje CO<sub>2</sub> je 31 °C, a pri temperaturi 12-15 °C potrebno je obezbediti nadpritisak od 60-65 bar da bi se ugljendioksid preveo u tečno stanje. U hermetički zatvorenim fermentorima dobija se ugljendioksid čistoće 99,0-99,5% sa sledećim primesama: etanol (0,4-0,8% težinskih na CO<sub>2</sub>), estri (0,03-0,4% na CO<sub>2</sub>), organske kiseline (0,08-0,09% na CO<sub>2</sub>) i tragovi aldehida. Sastav ugljendioksida zavisi od temperature fermentacije i sadržaja ugljenih hidrata u supstratu. Uklanjanje organskih primesa može se izvršiti adsorpcijom na aktivnom uglju, silikagelu ili zeolitu tipa NaA. Za sušenje ugljendioksida primenjuje se vodeni rastvor sumporne kiseline, CaCl<sub>2</sub> ili adsorpcija sa silikagelom. Prečišćen, osušen i komprimovani ugljendioksid se koristi u prehrambenoj industriji u procesima gaziranja bezalkoholnih napitaka, penušavih vina, šampanjca i mineralnih voda. Takođe se poslednjih godina proširila upotreba ugljendioksida u obradi metala rezanjem, u zavarivanju i livenju [4].

### 3.6. TEHNO-EKONOMSKI ASPEKTI PROIZVODNJE BIOETANOLA

I pored brojnih prednosti upotrebe bioetanola, troškovi proizvodnje ovog goriva su i dalje veći od troškova konkurenata na tržištu i najviše zavise od troškova sirovine, procesnih i kapitalnih troškova uključujući i cenu radne snage. Pored toga, na ukupnu cenu bioetanola utiču i mnogi drugi faktori kao što su: godišnji kapacitet proizvodnje, porezi, količina i vrsta utrošenih energenata, troškovi transporta, lokacija postrojenja itd. [4, 80]. Da bi bioetanol bio konkurentan motornom gorivu, troškovi proizvodnje i cena bioetanola se moraju smanjiti. Mnoge ekonomske analize su pokazale da je to moguće smanjenjem udela troškova sirovina, korišćenjem sirovina koje su nus proizvodi različitih tehnologija, iskorišćavanjem sporednih proizvoda i smanjenjem potrošnje energije [4]. Na ekonomičnost procesa proizvodnje bioetanola utiče i primenjena tehnologija procesa, kao i vrsta, razvoj i adaptiranost mikroorganizama na procesne uslove. U tom smislu favorizuju se savremeni postupci koji su daleko efikasniji i energetske povoljniji u fazama pripreme supstrata, fermentaciji i posebno destilaciji etanola. Povezanost procesnih i transportnih troškova je takva da ako se proizvodni troškovi smanje tehničkim usavršavanjem, transportni troškovi se posledično smanjuju na optimalnu vrednost. Ovo ukazuje na činjenicu da su manji proizvodni kapaciteti ekonomski atraktivniji [167].

Na cenu bioetanola značajno utiče cena sirovine, koja može iznositi oko 40% od cene bioetanola [168]. Cena sirovina koje se koriste za proizvodnju bioetanola veoma variraju na tržištu, što zavisi i od njihove potražnje za druge namene. Cena sirovine značajno zavisi i od valorizacije sporednih proizvoda. Cena žitarica u EU u periodu od 1999. do 2002. god. je iznosila oko 120 €/t. Ukoliko se usvoji da je prinos bioetanola po toni žitarici oko 360 l, može se izračunati da je cena žitarica (kao i kukuruza) za proizvodnju bioetanola oko 0,343 €/l bioetanola. U SAD-u kao najvećem proizvođaču bioetanola iz kukuruza, cena kukuruza (za period 2003-2005. god.) je 0,106 \$/l bioetanola (kod postupka mokrog mlevenja), odnosno 0,140 \$/l bioetanola (kod postupka suvog mlevenja) [4].

Prema izveštaju ECN („Energy Research Centre, Holandija), sadašnji troškovi proizvodnje bioetanola iz skrobnih odnosno šećernih sirovina su 20 €/GJ (kukuruz, SAD-0,42 €/l, ili 834 €/ten) i 15-25 €/GJ (šećerna repa, severozapadna Evropa). Ovo predstavlja prosečne troškove proizvodnje od oko 0,32-0,53 €/l bioetanola, ili 625-1040 €/ten [169]. U tabeli 3.3. prikazane su prosečne vrednosti troškova proizvodnje bioetanola iz pšenice i šećerne repe u Evropi (EU-25) u 2004. godini [169].

Tabela 3.3. Prosečni troškovi proizvodnje bioetanola iz pšenice i šećerne repe u Evropi (EU-25) u 2004. godini [169]

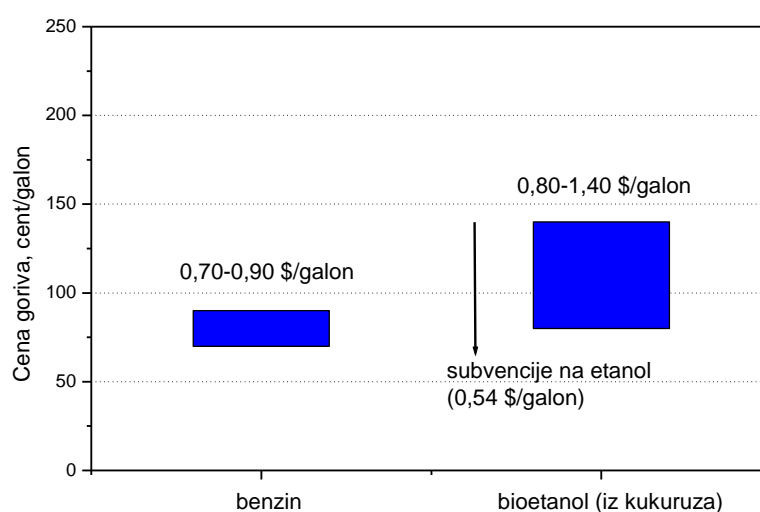
	Pšenica			Šećerna repa		
	€/l	€/GJ	€/ten	€/l	€/GJ	€/ten
Troškovi sirovine						
- cena sirovine	0,40	18,9	790	0,26	12,3	513
- prihod od sporednih proizvoda	0,15	7,1	296	0,03	1,4	59
Ukupni troškovi sirovine	0,25	11,8	493	0,23	10,9	454
Troškovi konverzije	0,28	13,3	553	0,22	10,4	434
Troškovi mešanja sa benzinom	0,05	2,4	99	0,05	2,4	99
Troškovi distribucije	0,01	0,5	20	0,1	4,7	197
<b>Ukupni troškovi</b>	<b>0,59</b>	<b>27,9</b>	<b>1.165</b>	<b>0,6</b>	<b>28,4</b>	<b>1.184</b>

U američkoj literaturi, tehno-ekonomske analize se najviše baziraju na proizvodnji bioetanola iz kukuruza. S obzirom na to da su prinosi bioetanola različiti u postupku suvog i mokrog mlevenja (slike 3.2. i 3.3.), samim tim se i razlikuju i ukupni troškovi proizvodnje, što je prikazano u tabeli 3.4. [170].

Cena bioetanola se u periodu 1998-2000. god. kretala u opsegu 1,05-1,50 \$/gal. Na slici 3.18. prikazana je cena bioetanola i njeno poređenje sa cenom benzina u 2004. godini prema izveštaju DOE („Department of Energy“, SAD) [171]. Sa slike 3.18. se može videti da je cena bioetanola viša od cene benzina. Pored već navedenih mera koje je potrebno preduzeti kako bi se smanjili troškovi proizvodnje bioetanola, takođe je potrebno da država odobri smanjenje poreza i taksi na bioetanol da bi se podstakla njegova proizvodnja i tako postigla cena koja bi bila konkurentna na tržištu.

Tabela 3.4. Troškovi sirovine i troškovi proizvodnje bioetanola iz kukuruza (za postupak suvog i mokrog mlevenja) u 2005. godini (\$/galon) [170]

	<i>Postupak suvog mlevenja</i>	<i>Postupak mokrog mlevenja</i>
<i>Troškovi sirovine</i>		
Cena sirovine	0,0774	0,7122
Prihod od sporednih proizvoda	0,2166	0,4108
Ugljendioksid	0,0068	0
Neto cena sirovine	0,4840	0,3014
<i>Operacioni troškovi</i>		
Električna energija	0,0581	0,0613
Goriva	0,2107	0,1449
Upravljanje otpadom	0,0067	0,0305
Voda	0,0034	0,0151
Enzimi	0,0416	0,0674
Kvasac	0,0049	0,0312
Hemikalije	0,0356	0,0546
Denaturant	0,0541	0,0594
Održavanje	0,0616	0,0882
Rad	0,0578	0,0929
Administrativni troškovi	0,0422	0,0553
Ostalo	0,0044	0
Ukupni operacioni troškovi	0,5811	0,7008
<b>Ukupni troškovi</b>	<b>1,0651</b>	<b>1,0022</b>



Slika 3.18. Cene benzina i bioetanola (iz kukuruza) u SAD-u u 2004. godini [171]

***EKSPERIMENTALNI DEO***



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. MATERIJALI

1. Kukuruzno brašno i kukuruzna krupica (Fabrika za preradu kukuruza “RJ CORN PRODUCT”, Sremska Mitrovica)
2. Kvasci iz kolekcije laboratorije za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*.
3. Imobilisane ćelije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* u Ca-alginatu, Poljoprivredni fakultet, Beograd
4. Za pravljenje mikrobioloških podloga korišćeni su:
  - sladni bujon (Torlak, Beograd)
  - agar (Torlak, Beograd)
5. Enzimski preparati:
  - Termamyl SC (Novozymes, Danska), aktivnost A=133 KNU/g
  - SAN Extra L (Novozymes, Danska), aktivnost A=437 AGU/g
6. Ostale korišćene hemikalije p.a. čistoće su:
  - kalcijum-hlorid-dihidrat  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Zdravlje, Leskovac)
  - sumporna kiselina  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Gamma Libero, Italija)
  - natrijum-hidroksid NaOH (Lachema, Češka)
  - magnezijum-sulfat-heptahidrat  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Zagreb)
  - amonijum-sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Alkaloid, Skoplje)
  - kalijum-dihidrogen-fosfat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lachema, Neratovce)
  - cink-sulfat-heptahidrat  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Zagreb)
  - 3,5-dinitrosalicilna kiselina  $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$  (Acros Organics, New Jersey, SAD)

- D (+)-glukoza monohidrat  $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$  (Kemika, Zagreb)
- natrijum-sulfit  $Na_2SO_3$  (Zorka, Šabac)
- kalijum-natrijum-tartarat  $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$  (Lachema, Češka)
- antron  $C_{14}H_{10}O$  (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- natrijum-hlorid  $NaCl$  (Zorka, Šabac)
- natrijum-citrat  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$  (Sigma, St. Louis, SAD)
- metilensko plavo (Hemos, Beograd)
- D-pantotenska kiselina, hemikalcijumova so  $C_9H_{16}NO_5 \cdot 0,5Ca$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka)
- biotin  $C_{10}H_{16}N_2O_3S$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka)
- mio-inozitol  $C_6H_{12}O_6$  (Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka)
- tiamin dihidrolid (vitamin B<sub>1</sub>-hidrohlorid)  $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot H_2O$  (Merck, Nemačka)
- piridoksin (vitamin B<sub>6</sub>-hidrohlorid)  $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$  (Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka)

Korišćeni uređaji i instrumenti su:

- vodeno kupatilo sa mešanjem, model WB/OB 7-45 (Memmert, Nemačka)
- analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)
- tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000)
- mikropipeta (ISO 9001 CERTIFIED, Nemačka)
- pH metar (inoLab pH 720, Nemačka)
- termostat za uzgajanje mikroorganizama na 30 °C (Sutjeska, Beograd)
- autoklav (Sutjeska, Beograd)
- magnetna mešalica, MR 3001 (Heidolph, Schwabach, Nemačka)
- vorteks, REAX 7000 (Heidolph, Schwabach, Nemačka)
- mikroskop, Axio Imager A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka)
- skenirajući elektronski mikroskop SEM, model JSM 5800 (Joel, Japan)
- električni rešo, Bauer GH-525 (JTD Ltd., Severna Koreja)
- UV/vidljivi spektrofotometar, Ultrospec 3300 pro (Biochrom Ltd., Cambridge, Engleska)

- mikrotalasna peć, model R-677 (Sharp Electronics, UK)
- ultrazvučno kupatilo, tip USK 28, radna frekvencija 40 kHz (EI Niš, Niš)
- centrifuga, model 2-16 (Sigma, Nemačka)
- polarimetar, 21304 (Schmidt Haensch, Nemačka)
- sušnica (Sutjeska, Beograd)

## 4.2. METODE

### 4.2.1. Izvođenje dvojno-enzimske hidrolize

Hidrolizati kukuruznog brašna (ili kukuruzne krupice) su dobijani dvojno-enzimskom hidrolizom skrobne suspenzije sa komercijalnim enzimskim preparatima: Temamyl SC, aktivnosti 133 KNU/g (KNU odnosno Kilo Novo Jedinica  $\alpha$ -amilaze je količina enzima koja razgrađuje 5,26 g skroba u toku jednog sata) i SAN Extra L deklarisanе aktivnosti od 437 AGU/g (AGU je količina enzima koja hidrolizuje 1  $\mu$ mol maltoze po minuti pod specificiranim uslovima).

Skrobna suspenzija je pripremljena mešanjem kukuruznog brašna (ili kukuruzne krupice) i vode u odnosu (pri hidromodulu) 1:2,5, 1:3 i 1:4. Suspenziji je dodato 60 ppm  $\text{Ca}^{2+}$  jona, u vidu  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , radi stabilizacije enzima i nekoliko kapi 1M NaOH za podešavanje pH vrednosti na 6,0. Faza likvefakcije je izvođena sa različitim koncentracijama enzima Termamyl SC na temperaturi od 85 °C u trajanju od 1 h.

Nakon završetka faze likvefakcije smeša je ohlađena, i podešena je pH vrednost na 5,0 sa 1M rastvorom sumporne kiseline. Faza saharifikacije je izvođena sa različitim koncentracijama enzima SAN Extra L na temperaturi od 55 °C u trajanju od 4 h. Obe faze hidrolize izvođene su u balonima u vodenom kupatilu sa konstantnim mešanjem (150 rpm).

Radi ispitivanja kinetike enzimske hidrolize uzorci za određivanje koncentracije glukoze analizirani su na svakih sat vremena.

Pri optimizaciji faze likvefakcije i saharifikacije pored promene koncentracije glukoze praćena je i promena prinosa glukoze, dekstroznog ekvivalenta i procenta od

teorijske koncentracije glukoze tokom enzimske hidrolize. Dekstrozni ekvivalent je indikator stepena hidrolize skroba do šećera, odnosno predstavlja sadržaj redukujućih šećera izražen kao glukoza (dekstroza) na suhu materiju (grama glukoze/100 g suve materije). Jednačine za izračunavanje prinosa glukoze, dekstroznog ekvivalenta [172] i procenta od teorijske koncentracije glukoze [173] su sledeće:

$$Y'_{P/S} \text{ (g/g)} = \frac{c_{glu}}{c_s} \quad (2)$$

- $Y'_{P/S}$  – prinos glukoze (g/g)
- $c_{glu}$  – eksperimentalna koncentracija glukoze (g/l)
- $c_s$  – početna koncentracija skroba u suspenziji (g/l)

$$DE = \frac{c_{glu}}{SM} \cdot 100 \quad (3)$$

- DE – dekstrozni ekvivalent (%)
- $c_{glu}$  – eksperimentalna koncentracija glukoze (%)
- SM - sadržaj suve materije kukuruznog brašna koji iznosi 82,66%

$$\% \text{ od } c_{glu, teor} = \frac{c_{glu}}{c_{glu, teor}} \cdot 100 \quad (4)$$

- % od  $c_{glu, teor}$  – procenat od teorijske koncentracije glukoze (%)
- $c_{glu, exp}$  – eksperimentalna koncentracija glukoze (g/l)
- $c_{glu, teor}$  – teorijska koncentracija glukoze (g/l)

$$c_{glu, teor} = c_s \cdot 1,111 \quad (5)$$

- $c_s$  – početna koncentracija skroba u suspenziji (g/l)  
(hidromodulu 1:3 odgovara teorijska konc. glukoze od 213,17 g/l)
- faktor 1,111 je izveden na osnovu činjenice da je potreban 1 molekul vode za hidrolizu svake glikozidne veze u skrobu. Na osnovu stehiometrijske jednačine hidrolize skroba do glukoze, ovaj faktor je jednak odnosu  $180n/(162n + 18)$ , gde je n broj ostataka glukoze u polimeru skroba.

U eksperimentima u kojima se ispitivao uticaj početne koncentracije glukoze na tok alkoholne fermentacije i prinos etanola, koncentracija glukoze u hidrolizatu koja je određivana nakon završene enzimske hidrolize podešavana je na željenu vrednost na osnovu proračuna razblaženja. Ovaj proračun razblaženja se zasniva na zakonu održanja mase:  $m_1 = m_2 = \text{const}$ . Ako je koncentracija glukoze u hidrolizatu nakon završene enzimske hidrolize  $c_1$ , zapremina hidrolizata  $V_1$ , i je potrebno da koncentracija glukoze u hidrolizatu bude  $c_2$ , sledi:

$$m_1 = m_2 \quad (6)$$

$$c = m/V \rightarrow c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_2 = (c_1 \cdot V_1) / c_2 \quad (7)$$

Prema tome, zapremina vode koja se dodaje u hidrolizat je:

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = V_2 - V_1 \quad (8)$$

#### 4.2.2. Predtretman suspenzije kukuruznog brašna ultrazvukom

Suspenzije kukuruznog brašna i vode pripremljene su na prethodno opisan način (uz dodavanje  $\text{Ca}^{2+}$  jona i regulisanje pH) u balonima od 100 ml, pri hidromodulu 1:3. Predtretman pripremljenih suspenzija ultrazvukom je vršen u ultrazvučnom kupatilu, pri frekvenciji ultrazvučnih talasa od 40 kHz. Varirano je vreme dejstva ultrazvuka i trenutak dodavanja enzima Termamyl SC, kao i temperatura soniciranja kako bi se optimizovao predtretman ultrazvukom radi bolje razgradnje skroba i dobijanja više koncentracije glukoze nakon završene enzimske hidrolize. Korišćena je optimalna koncentracija enzima Termamyl SC i SAN Extra L koja je određena u prethodnim eksperimentima optimizacije dvojno-enzimske hidrolize.

#### 4.2.3. Predtretman suspenzije kukuruznog brašna mikrotalasima

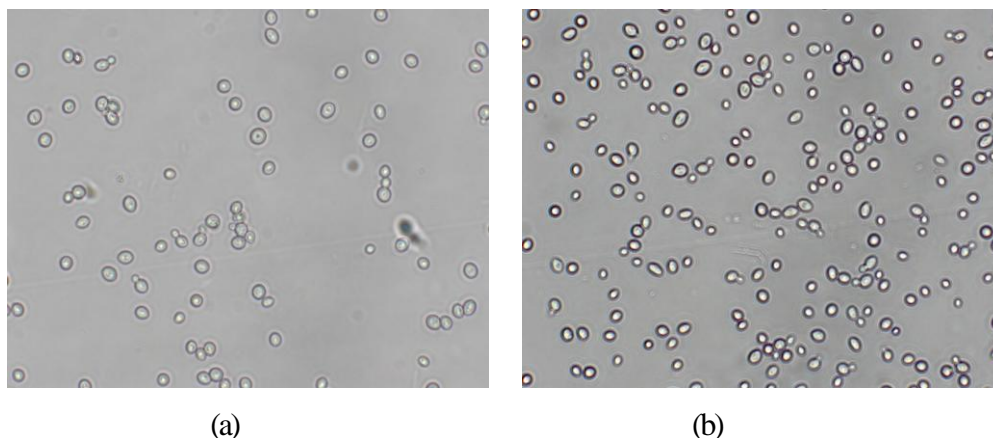
Suspenzije kukuruznog brašna i vode pripremljene su na prethodno opisan način u balonima od 100 ml, pri hidromodulu 1:3. Predtretman pripremljenih suspenzija mikrotalasima je izvođen u mikrotalasnoj peći, u toku različitog vremenskog perioda i pri

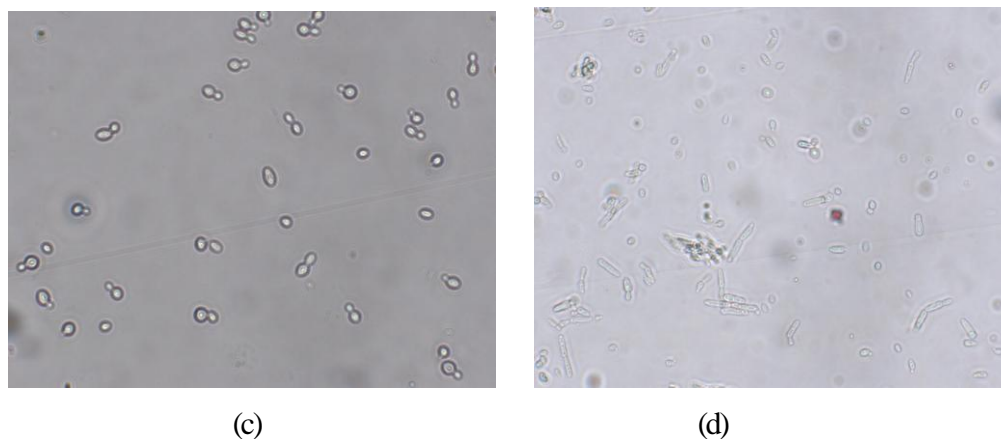
različitoj snazi mikrotalasa kako bi se postigla što bolja razgradnja kukuruznog skroba. Korišćena je optimalna koncentracija enzima Termamyl SC i SAN Extra L koja je određena u prethodnim eksperimentima optimizacije dvojno-enzimske hidrolize.

#### 4.2.4. Priprema laboratorijske kulture

Kultura kvasca je čuvana na kosom sladnom agaru na +4 °C, a za potrebe eksperimenta aktivirana je u sladnom bujonu korišćenjem tehnike pasažiranja (3 puta). 24 h pre početka alkoholne fermentacije vršeno je zasejavanje 50 ml sladnog bujona korišćenjem 1% inokuluma. Inkubacija je vršena 24 h u termostatu na temperaturi od 30 °C. Nakon inkubacije podloga je zamućena, bez promene boje, nema površinskog rasta, a formiran talog je sitnozrn i beo. Ovako dobijena sveža kultura je korišćena za inokulaciju hidrolizata kukuruznog brašna. Takođe, nakon inkubacije pravljeni su nativni preparati kako bi se posmatrale izrasle kolonije. Preparati su posmatrani pod mikroskopom sa uveličanjem 40×10, a izgled ćelija ispitivanih kvasaca je prikazan na slici 4.1.

1 l podloge sladni agar sadrži 20 g sladnog bujona (sastavljenog od 17 g sladnog ekstrakta i 3 g peptona) i 18 g agara koji se dodaje za očvršćavanje mikrobioloških podloga. Podloga se sterilise u autoklavu na temperaturi od 120 °C i pritisku od 1,5 bar u toku 30 min.





Slika 4.1. Mikroskopska slika ispitivanih vrsta kvasaca: a) *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, b) *S. cerevisiae*, c) *S. carlsbergensis* i d) *Schizosaccharomyces pombe*

#### 4.2.5. Testovi karakterizacije kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*

Pripremljene su epruvete sa sladnim bujonom u kojima je dodat etanol ili glukoza, a u pojedinim epruvetama je i regulisana pH vrednost. U pet epruveta je dodat različit sadržaj glukoze (5, 10, 15, 20 i 25%), dok je u drugih pet epruveta regulisan pH do sledećih vrednosti: 2,00; 2,50; 3,00; 3,79; 4,77 i 5,25 pomoću 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. U devet epruveta je dodat različit sadržaj 96% etanola kako bi se postigle koncentracije od 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 i 25% etanola u sladnom bujonu. U ovako pripremljene podloge zasejana je kultura kvasca i epruvete su termostatirane na 30 °C. Nakon 24 h, pojava zamućenja u ispitivanim epruvetama ukazuje na sposobnost kvasca da raste pri datim uslovima. Epruvete u kojima se nije pojavilo zamućenje ukazivale su na izostanak rasta. Radi potvrde rasta, kultura je presejana na novi pasaż i nakon 48 h praćena je pojava zamućenja. Uzorci u kojima nije bilo zamućenja i nakon 48 h striklovani su na Petri šolje sa sladnim agarom. Prisustvo manjeg ili većeg broja kolonija kvasca izraslih na Petri šolji nakon inkubacije (24-48 h na 30 °C) ukazuje da tu koncentraciju etanola ili pH vrednost podloge kvasac može da toleriše, ali da pri njoj ne dolazi do rasta ćelija. Ukoliko na sladnom agaru nisu izrasle kolonije, data koncentracija može se smatrati inhibitornom za dalji rast ispitivanog kvasca.

#### 4.2.6. Izvođenje alkoholne fermentacije

Alkoholna fermentacija hidrolizata kukuruznog brašna je izvođena u anaerobnim uslovima, u šaržnom postupku sa izabranim kulturama kvasaca na temperaturi od 30 °C, u vodenom kupatilu bez mešanja. Pre početka fermentacije hidrolizat je obogaćen faktorima rasta: 0,4 g/l MgSO<sub>4</sub>, 2,0 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 4,0 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. U toku fermentacije vršeno je korigovanje pH vrednosti na 5.

U cilju ispitivanja fermentativne sposobnosti različitih vrsta, fermentacija je izvođena sa slobodnim ćelijama sledećih vrsta kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* i *Schizosaccharomyces pombe*, pri koncentraciji inokuluma od 2% (v/v) u toku 48 h.

U daljim eksperimentima korišćene su slobodne i imobilisane ćelije kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u Ca-alginatu, pri različitim koncentracijama inokuluma (2, 5 i 10% v/v). Radi optimizacije procesa takođe je varirana i polazna koncentracija glukoze u cilju dobijanja većeg prinosa etanola. Vršeni su i eksperimenti sa dodatkom aktivatora: mineralnih soli (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,3 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,0 g/l) i vitamina (Ca-pantotenat 2,0 g/l, biotin 64,0·10<sup>3</sup> mg/l, inozitol 1 g/l, tiamin 5,0 mg/l, piridoksin 5,0 mg/l), pojedinačno ili u smeši, koji pozitivno utiču na rast i viabilnost ćelija kvasca i povećavaju efikasnost alkoholne fermentacije. Paralelno je rađen i kontrolni uzorak bez dodatka pomenutih aktivatora.

Tok fermentacije praćen je određivanjem promene sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija kvasca. Kinetika fermentacije je praćena u toku različitih vremenskih perioda: 38, 48 i 72 h radi određivanja optimalne dužine trajanja alkoholne fermentacije, pri različitim uslovima eksperimenta. Tokom fermentacije praćena je i promena sledećih parametara: prinos etanola, procenat od teorijskog sadržaja etanola, volumetrijska produktivnost i potrošnja glukoze. Ovi procesni parametri se računaju prema sledećim jednačinama [174]:



$$Y_{P/S} = \frac{c_{et}}{c_s} \quad (9)$$

- $Y_{P/S}$  – prinos etanola (g/g)
- $c_{et}$  – eksperimentalni sadržaj etanola (%)
- $c_s$  – početna koncentracija skroba u suspenziji (g/l)  
( $c_s = 191,87$  g/l pri hidromodulu 1:3)

$$\% \text{ od } c_{et, teor} = \frac{c_{et}}{c_{et, teor}} \cdot 100 \quad (10)$$

- % od  $c_{et, teor}$  – procenat od teorijskog sadržaja etanola
- $c_{et}$  – eksperimentalni sadržaj etanola (%)
- $c_{et, teor}$  – teorijski sadržaj etanola (%)

$$c_{et, teor} = c_{glu, teor} \cdot 0,51 = 21,32\% \cdot 0,51 = 10,87\% \quad (11)$$

- $c_{glu, teor}$  – teorijska koncentracija glukoze, za hidromodul 1:3 iznosi 21,32%  
(na osnovu stehiometrijske jednačine (1) iz 1 g glukoze dobija se 0,51 g etanola)

$$P = \frac{c_{et}}{\tau} \quad (12)$$

- $P$  – volumetrijska produktivnost (g/l·h)
- $c_{et}$  – eksperimentalni sadržaj etanola (g/l)
- $\tau$  – vreme fermentacije (h)

$$\text{Potrošnja glukoze (\%)} = \frac{c_{glu, kr} - c_{glu, poč.}}{c_{glu, poč.}} \cdot 100 \quad (13)$$

- $c_{glu, poč.}$  – početna koncentracija glukoze u hidrolizatu (g/l)
- $c_{glu, kr.}$  – krajnja koncentracija glukoze (g/l)

U eksperimentima sa recirkulacijom kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* imobilisanog u Ca-alginatu, nakon završenog prvog ciklusa šaržne fermentacije u trajanju od 38 h, vršeno je razdvajanje imobilisanih ćelija i profermentisane tečnosti

centrifugiranjem (10 min, 4000 rpm) i dekantovanjem. Izdvojene imobilisane ćelije su ispirane fiziološkim rastvorom kako bi se uklonili ostaci fermentacione tečnosti, a zatim su čuvane u fiziološkom rastvoru do ponovnog dodavanja u sveže pripremljen hidrolizat kukuruznog brašna. Pre svake recirkulacije vršeno je određivanje i korigovanje početnog broja ćelija kvasca. Postupak recirkulacije imobilisanih ćelija vršen je do prestanka sinteze etanola ili stagnacije i pada broja ćelija kvasca.

#### 4.2.7. Izvođenje postupka simultane saharifikacije i fermentacije (SSF)

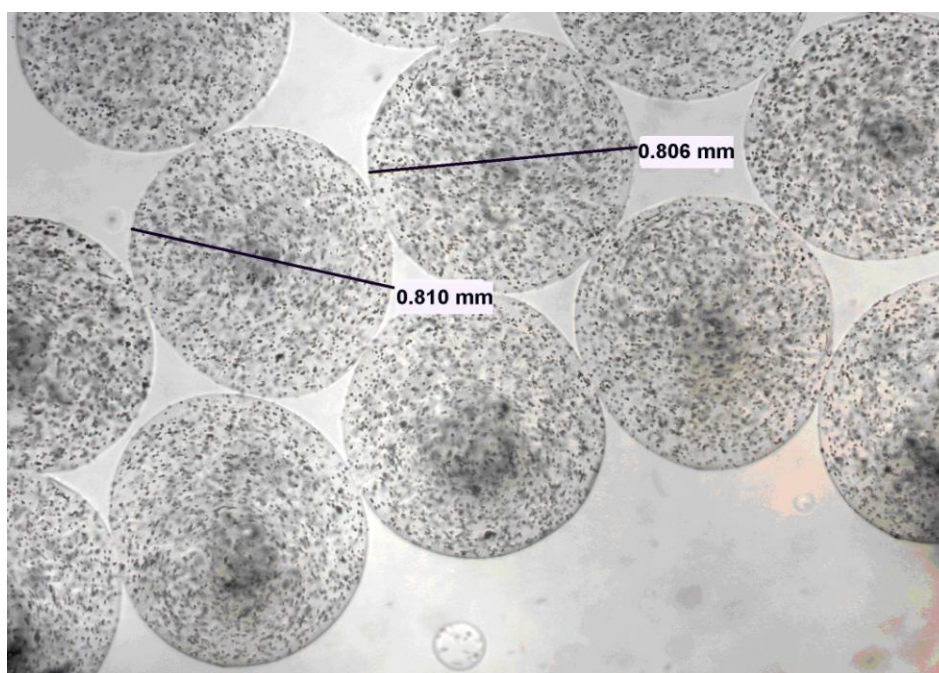
U eksperimentima u kojima se izvodi postupak simultane saharifikacije i fermentacije (SSF proces), nakon završene likvefakcije suspenzija se ohladi i koriguje se pH vrednost na 5,0 pomoću 1 M rastvora sumporne kiseline. Istovremeno se dodaju: enzim SAN Extra L (u optimalnoj koncentraciji koja je određena u prethodnim eksperimentima enzimske hidrolize) i slobodne ili imobilisane ćelije kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (pri koncentraciji inokuluma od 2% v/v). Simultana saharifikacija i fermentacija izvođena je u balonima u vodenom kupatilu sa brzinom mešanja 100 rpm. Kinetika SSF procesa je ispitivana u toku 48 h, na temperaturama 30, 37 i 42 °C. Radi povećanja prinosa etanola i efikasnosti samog procesa vršeno je dodavanje mineralnih soli (0,3 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i 2,0 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), i vitamina (30,0 mg/l Ca-pantotenata,  $64,0 \cdot 10^3$  mg/l biotina i 350,0 mg/l inozitola), pojedinačno ili u smeši. Paralelno je rađen i kontrolni uzorak bez dodatka pomenutih aktivatora. Takođe je ispitivan i SSF proces suspenzije kukuruznog brašna koja je podvrgnuta predtretmanu ultrazvukom i mikrotalasima (pri optimalnim parametrima delovanja ultrazvuka i mikrotalasa koji su određeni u prethodnim eksperimentima).

#### 4.2.8. Postupak imobilizacije ćelija kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u Ca-alginatu

Imobilizacija ćelija kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* je izvršena obuhvatanjem u gel Ca-alginata. Za imobilizaciju ćelija korišćen je 2% (w/w) rastvor Na-alginata dobijenog ratvaranjem 4,8 g Na-alginata u prahu u 240 ml destilovane vode. Kvasac je zasejan u sterilnu podlogu na 30 °C. Podloga je sledećeg sastava: u 1 l destilovane vode rastvoreno je

100 g glukoze, 2 g ekstrakta kvasca, 2,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 50 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g  $\text{NaCl}$ , 0,01 g  $\text{KCl}$  i 3 g limunske kiseline. Medijum je sterilisan 30 minuta na  $120^\circ\text{C}$ .

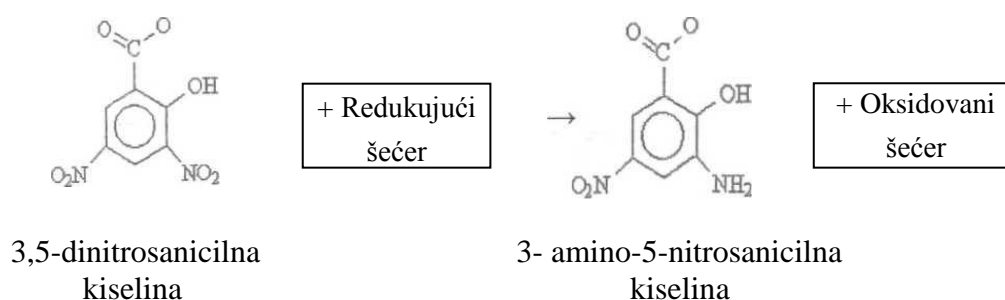
Suspenzija polimer-ćelija je formirana mešanjem 240 ml rastvora Na-alginata sa 60 ml koncentrovane suspenzije kvasca na sobnoj temperaturi. Sa vrha igle pri konstantnom protoku od 0,25 ml/min izvršena je ekstruzija prethodno pripremljene suspenzije polimer-ćelija, i pri tome se pod dejstvom elektrostatičkih i gravitacionih sila formiraju kapljice. Elektrostatički potencijal se formira povezivanjem pozitivne elektrode visokog napona u posudu sa 2,65% rastvorenim  $\text{CaCl}_2$  pri čemu je igla uzemljena. Na ovaj način će ćelije kvasca biti obuhvaćene u gel Ca-alginata. Ovako imobilisane ćelije se čuvaju u fiziološkom rastvoru na  $8^\circ\text{C}$ . Imobilisane ćelije, kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u Ca-alginatu, sa relativno ujednačenim prosečnim prečnikom od 0,8 mm, prikazane su na slici 4.2.



Slika 4.2. Mikroskopska slika imobilisanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u Ca-alginatu

#### 4.2.9. Određivanje sadržaja redukujućih šećera u hidrolizatu [175]

Sadržaj glukoze je određivan spektrofotometrijskom metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS). Ovom metodom se određuje prisustvo slobodne karbonilne grupe (C=O) kod redukujućih šećera. To podrazumeva oksidaciju aldehidne funkcionalne grupe (kod glukoze), odnosno keto funkcionalne grupe (kod fruktoze) do karboksilne grupe. Oksidacija se odvija u prisustvu 3,5-dinitrosalicilne kiseline koja se redukuje do 3-amino,5-nitrosalicilne kiseline u alkalnoj sredini sa karakterističnim crvenobraon obojenjem. Ova reakcija je prikazana na slici 4.3.



Slika 4.3. Reakcija 3,5-dinitrosalicilne kiseline sa redukujućim šećerima

#### Reagensi:

- 1% rastvor 3,5-dinitrosalicilne kiseline:
  - 10 g dinitrosalicilne kiseline
  - 0,5 g natrijum-sulfita  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
  - 10 g natrijum-hidroksida  $\text{NaOH}$
  - dodati vodu do 1 l.
- 40% rastvor kalijum-natrijum tartarata

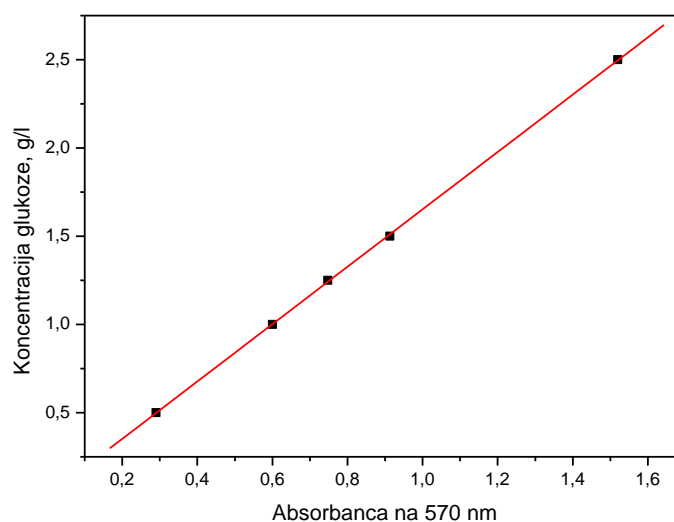
#### Postupak:

1 ml filtrata hidrolizata se pipetom prenese u normalni sud od 100 ili 250 ml u zavisnosti od očekivane koncentracije glukoze, koji se zatim postepeno dopuni destilovanom vodom. Iz normalnog suda se uzme 3 ml razblaženog rastvora šećera i prenese u epruvetu, a zatim doda 3 ml rastvora dinitrosalicilne kiseline. Takođe, pravi

se kontrolni uzorak za kalibrisanje spektrofotometra kod koga se umesto 3 ml razblaženog rastvora šećera doda 3 ml destilovane vode, dalji postupak je identičan. Epruvete se zatvore i kuvaju u vodenom kupatilu na 90 °C u trajanju od 5-15 minuta do nastanka crveno-braon obojenja. Kontrolni uzorak zadržava žutu boju. Zatim se u topao rastvor dodaje 1 ml rastvora kalijum-natrijum-tartarata kako bi se stabilizovala boja. Sadržaj u epruvetama se ohladi do sobne temperature i zatim se meri absorbanca na spektrofotometru na 570 nm. Koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao glukoza, se određuje iz standardne krive koja je dobijena merenjem absorbance rastvora glukoze poznatih koncentracija na 570 nm. U tabeli 4.1. su prikazane dobijene vrednosti absorbance za standardne koncentracije rastvora glukoze, a na slici 4.4. je prikazana standardna kriva zavisnosti koncentracije glukoze od absorbance na 570 nm.

Tabela 4.1. Zavisnost apsorbance na 570 nm od koncentracije standardnog rastvora glukoze

<b>Koncentracija glukoze, g/l</b>	<b>Absorbanca na 570 nm</b>
0,50	0,29
1,00	0,60
1,25	0,748
1,50	0,913
2,50	1,52



Slika 4.4. Kriva zavisnosti koncentracije rastvora glukoze od absorbance na 570 nm

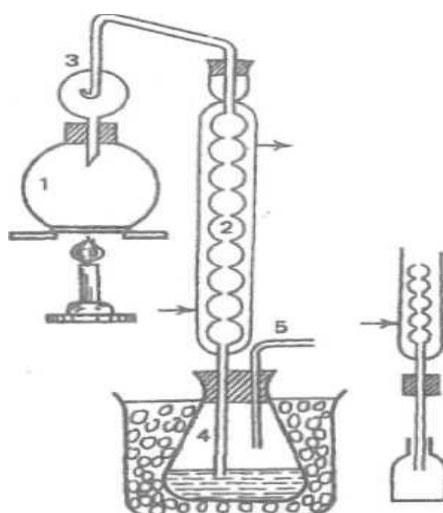
Jednačina krive prikazana na slici 4.4. je:  $y = 1,6251 \cdot x + 0,02684$ , pa se koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao glukoza, izračunava prema sledećoj jednačini:

$$c_{\text{glu}} \text{ (g/l)} = (1,6251 \cdot A + 0,02684) \cdot R \quad (14)$$

- $c_{\text{glu}}$  - koncentracija glukoze (g/l)
- A - absorbanca na 570 nm
- R - razblaženje rastvora šećera (100 ili 250)

#### 4.2.10. Određivanje sadržaja etanola [176]

Metoda se zasniva na zavisnosti gustine destilata etanola od sadržaja etanola. Pošto je etanol specifično lakši od vode, sa porastom njegovog sadržaja u vodi opada gustina destilata. Rauscher i Voidt su dali tabelu zavisnosti gustine od sadržaja etanola u vodi na temperaturi od 20 °C (tabela I data je u prilogu). Pored etanola destilišu i druge isparljive materije koje nastaju u toku fermentacije. U većini slučajeva sadržaj isparljivih komponenti je veoma nizak pa se njihov uticaj na gustinu može zanemariti. Za destilaciju se koristi aparatura prikazana na slici 4.5.



Slika 4.5. Šema aparature za destilaciju

*Postupak:*

Pre početka destilacije potrebno je na analitičkoj vagi izmeriti masu praznog piknometra (zapremine 50 cm<sup>3</sup>), kao i masu piknometra napunjenog sa destilovanom vodom.

U izmerenu tikvicu (1) od 300-500 cm<sup>3</sup> odmeri se n grama (oko 40 g) fermentisane suspenzije. Zatim se sud spoji pomoću gumenog zatvarača sa Liebig-ovim kondenzatorom (2). Destilat se prihvata u praznom piknometru (4), koji može da bude uronjen u posudu sa ledom, kao što je prikazano na slici 4.6. Sud se mora zagrevati tako da se destilacija završi u toku 30-45 min. Nakon završene destilacije piknometar se dopuni destilovanom vodom i suv odmeri na analitičkoj vagi. Deflegmator (3) i cev (5) su prilikom izvođenja eksperimenta izostavljeni.

Sadržaj etanola u destilatu se određuje merenjem gustine  $\rho^{20}$  prema sledećoj jednačini:

$$\rho^{20} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \quad (15)$$

- A - masa praznog piknometra (g)
- B - masa piknometra sa destilovanom vodom (g)
- C - masa piknometra sa destilatom (g)

Na osnovu izračunate vrednosti  $\rho^{20}$  iz tabele I (u prilogu) očitava se sadržaj etanola u destilatu (u masenim %), a potom se sadržaj etanola u fermentisanoj suspenziji izračunava prema sledećoj jednačini:

$$c_{et} (\% w/w) = (a \cdot c) / n \quad (16)$$

- $c_{et}$  - sadržaj etanola (% w/w)
- a - masa destilata, odnosno izraz (C-A) iz jednačine (15)
- c - sadržaj etanola u destilatu u mas.% (iz tabele I)
- n - masa uzetog uzorka (g)

#### **4.2.11. Određivanje ukupnog broja ćelija kvasca**

##### ***4.2.11.1. Kohova metoda agarne ploče [177]***

Ukoliko je alkoholna fermentacija vršena sa slobodnim ćelijama kvasca, 1 ml hidrolizata se rastvori u 9 ml fiziološkog rastvora, i na taj način se dobija razblaženje  $10^{-1}$ . Zatim se vrši serija razblaženja, gde je svako sledeće razblaženje deset puta veće od prethodnog. 1ml iz epruveta sa razblaženjima  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-8}$  prenet je pipetom u Petri šolje, koje su prelivane hranljivom podlogom sladni agar. Inkubacija Petri šolja vršena je u termostatu na  $30^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 48 h. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. Ukupan broj živih ćelija u 1 ml hidrolizata dobija se množenjem ukupnog broja kolonija izbrojanih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem. U slučaju da postoje prisutne ćelije kod sva tri razblaženja traži se srednja vrednost broja ćelija.

Ukoliko se određuje ukupan broj ćelija u imobilizatu, imobilisane ćelije kvasca su prethodne filtrirane radi odvajanja od fermentisane suspenzije. Zatim se 1 g imobilizata rastvori u 9 ml 2% Na-citrata, čime se dobija razblaženje  $10^{-1}$ . Nakon toga se vrši postepeno razblaživanje u fiziološkom rastvoru do razblaženja  $10^{-8}$ . Dalji postupak određivanja ukupnog broja živih ćelija je identičan kao u slučaju sa slobodnim ćelijama kvasca.

##### ***4.2.11.2. Direktno brojanje pomoću komore za brojanje po Rosenthal-u [177]***

U slučaju kada je vršena recirkulacija imobilisanog kvasca, nakon završenog prvog i drugog ciklusa šaržne fermentacije vrši se razdvajanje imobilisanih ćelija od fermentisane suspenzije dekantovanjem, centrifugiranjem i ispiranjem fiziološkim rastvorom kako bi se uklonili ostaci fermentacione tečnosti. Pre svake recirkulacije određivan je početan broj ćelija kvasca pomoću komore za brojanje po Rosenthal-u. Ova metoda se zasniva na direktnom brojanju ćelija u nativnom preparatu pod mikroskopom. Komora za brojanje ima oblik predmetnice od debljeg stakla na čijem središnjem delu se nalazi ugravirana specijalna mrežica sa tačno određenim dimenzijama. Brojanjem ćelija u pojedinim



kvadratima mrežice može se odrediti njihov broj pomoću odgovarajuće formule. Komora po Rosenthal-u je podeljena na 16 većih kvadrata, a svaki od njih na 16 manjih kvadrata. Površina velikog kvadrata je  $1 \text{ mm}^2$ , a zapremina  $0,2 \text{ mm}^3$ . Površina malog kvadrata je  $0,0625 \text{ mm}^2$ , a zapremina  $0,0125 \text{ mm}^3$ .

Brojanje ćelija je vršeno iz razblaženja  $10^{-2}$ . Razblaženje  $10^{-1}$  se dobija rastvaranjem 1 g imobilizata u 9 ml 2% Na-citrata, a razblaženje  $10^{-2}$  daljim razblaživanjem u fiziološkom rastvoru. Zatim se 1 ml razblaženja  $10^{-2}$  pomeša sa 1 ml boje metilensko plavo u epruveti, odakle se pipetom uzima jedna kap koja se nanosi na deo komore za brojanje gde se nalazi mrežica. Nanešena kap se prekrije ljuspicom. Ovako pripremljeni obojeni nativni preparat se posmatra pod mikroskopom kroz objektiv uveličanja  $40\times$ , sa podignutim kondenzatorom. Žive ćelije kvasca ostaju neobojene jer sadrže enzim dehidrogenazu koji redukuje boju metilensko plavo u njen bezbojan oblik, dok mrtve ćelije ostaju obojene u plavo. Ovo pruža mogućnost da se brojanjem ćelija u pojedinim kvadratima mrežice utvrdi približan broj živih ćelija kvasca. Brojanje ćelija se vrši prema sledećoj formuli:

$$N \text{ (CFU/g)} = (m/K) \cdot n \cdot 16 \cdot 5 \cdot 10^3 \quad (17)$$

- N – broj živih ćelija kvasca (CFU/g imobilizata)
- m/K – srednja vrednost broja ćelija u jednom malom kvadratu
- n – razblaženje ( $10^2$ )
- 16 – broj malih kvadrata u velikom kvadratu
- 5 – zapremina u  $\text{mm}^3$  ( $1/5 \text{ mm}^3$ )
- $10^3$  – pomnoženo sa 1000 da bi se dobio broj ćelija u 1 ml

#### 4.2.12. Polarimetrijska metoda za određivanje sadržaja kukuruznog skroba [178]

Ova metoda obuhvata dva merenja. Prvo se uzorak tretira sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom, i nakon bistrenja i filtracije, određuje se optička rotacija na polarimetru. U drugom merenju uzorak se tretira sa 40% etanolom. Dobijeni ekstrakt se filtrira, tretira sa kiselinom i ponavlja isti postupak kao kod prvog merenja. Ova metoda se zasniva na tome da se tretiranjem materijala koji sadrži skrob hlorovodiničnom kiselinom,

vrši hidroliza skroba. Nastali šećeri su optički aktivni i skreću ravan polarizovane svetlosti. Iz veličine ugla optičkog skretanja ravni linearno polarizovane svetlosti određuje se sadržaj skroba. Za određivanje sadržaja skroba u kukuruznoj krupici (ili kukuruznom brašnu) nakon hidrolize, neophodno je izvršiti korekciju veličine ugla skretanja ravni linearno polarizovane svetlosti, koja potiče od supstanci koje nisu skrob. Naime, tako zaostali kukuruzni hidrolizat sadrži čitav spektar redukujućih šećera. Šećeri prisutni u hidrolizatu takođe skreću ravan polarizovane svetlosti, pa je sadržaj nehidrolizovanog skroba određen standardnom metodom mnogo veći.

*Reagensi:*

- 25% (w/w) hlorovodonična kiselina
- 1,128% (w/v) hlorovodonična kiselina  
Koncentracija se mora proveriti titracijom sa 0,1M NaOH u prisustvu 0,1% (w/v) rastvora metil-crvenog u 94% (v/v) etanolu. 10 ml = 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l
- Rastvor Carrez I: rastvoriti 21,9 g cink-acetata  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  i 3 g glacijalne sirćetne kiseline u vodi. Dopuniti vodom do 100 ml.
- Rastvor Carrez II: rastvoriti 10,6 g kalijum-fero-cijanida  $[K_4(Fe(CN)_6)] \cdot 3H_2O$  u vodi. Dopuniti vodom do 100 ml.
- 40% (v/v) etanol

*Postupak:*

- Određivanje ukupne optičke rotacije

Odmeri se 2,5 g usitnjenog uzorka i prenese u normalni sud od 100 ml. Doda se 25 ml 1,128% HCl, promeša, pa ponovo doda još 25 ml. Normalni sud se uroni u ključalu vodu vodenog kupatila, mešajući energično i neprestano prva tri minuta, da ne bi došlo do stvaranja aglomerata. Količina vode u vodenom kupatilu mora biti dovoljna da ostane na tački ključanja dok je normalni sud uronjen u njemu. Normalni sud se pri mešanju ne sme vaditi iz vode. Posle tačno 15 minuta, izvadi se iz kupatila, doda 30 ml hladne vode i ohladi odmah do 20 °C.

Doda se 5 ml rastvora Carrez I i meša 1 minut. Zatim se doda 5 ml rastvora Carrez II i meša ponovo 1 minut. Dopuni se vodom do 100 ml, promeša i filtrira. Izmeri se optička rotacija rastvora na polarimetru.

- Određivanje optičke rotacije supstanci rastvorljivih u 40 %-tnom etanolu

Odmeri se 5 g uzorka, prenese u normalni sud od 100 ml i doda 80 ml 40% etanola. Ostavi se da stoji 1 h na sobnoj temperaturi i za to vreme povremeno energično promeša. Nakon 1 h dopuni se do 100 ml sa etanolom, promeša i filtrira. Pipetira se 50 ml filtrata u erlenmajer od 250 ml, doda 2,1 ml 25% HCl i promeša energično. Postavi se povratni kondenzator na erlenmajer koji je uronjen u ključalo vodeno kupatilo. Posle tačno 15 minuta erlenmajer se izvadi iz vodenog kupatila, prespe sadržaj u normalni sud od 100 ml, ispirajući sa malo hladne vode i ohladi do 20 °C. Ponovi se postupak sa rastvorima Carrez I i Carrez II, dopuni vodom do 100 ml, promeša, filtrira i izmeri optička rotacija.

*Izračunavanje:*

Pri korišćenju polarimetra potrebno je izmerenu vrednost ugla skretanja ravni polarizovane svetlosti u stepenima po Wentzke-u pomnožiti sa 0,3469 da bi se preveli u uglovne stepene. Sadržaj skroba se računa prema sledećoj jednačini:

$$c_s (\%) = [(\alpha - \alpha') \cdot 0,3469 \cdot 100 \cdot 40] / (l \cdot [\alpha]_D^{20}) \quad (18)$$

- $c_s$  – sadržaj skroba (%)
- $\alpha$  – izmereni ugao skretanja ravni linearno polarizovane svetlosti
- $\alpha'$  – izmereni ugao skretanja ravni linearno polarizovane svetlosti kod rastvora dobijenog alkoholnom ekstrakcijom vlažnog materijala
- $[\alpha]_D^{20}$  – specifični ugao skretanja ravni polarizovane svetlosti na 20 °C kada se koristi Na-D-linija (za kukuruz iznosi 182,6°)
- $l$  – dužina polarimetrijske cevi u dm ( $l = 2$  dm)

#### 4.2.13. Metoda za određivanje sadržaja suve materije [176]

*Postupak:*

Prazan vegeglas se suši najmanje 1 h u sušnici na temperaturi od 105 °C. Nakon toga, vegeglas se ohladi u eksikatoru (sa zatvorenim poklopcem) do sobne temperature i izmeri se njegova masa na analitičkoj vagi sa tačnošću  $\pm 0,001$  g.

Zatim se u vegeglas dodaje oko 2 g uzorka i izmeri masa. Vegeglas se suši sa uzorkom tokom noći (najmanje 16 h) u sušnici na 105 °C, sa koso postavljenim

poklopcem. Nakon sušenja vegeglas se pokrije poklopcem i hladi u eksikatoru oko 1 h. Merenje se vrši odmah nakon vađenja vegeglasa iz eksikatora. Izvrši se ponovno sušenje, 30-60 min, dok se ne postigne konstantna masa.

*Izračunavanje:*

$$\text{SM (\%)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \quad (19)$$

- $m_0$  – masa praznog vegeglasa (g)
- $m_1$  – masa vegeglasa sa uzorkom pre sušenja (g)
- $m_2$  – masa vegeglasa sa uzorkom posle sušenja (g)

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. DVOJNO-ENZIMSKA HIDROLIZA KUKURUZNOG SKROBA

#### 5.1.1. Hemijski sastav kukuruzne krupice i kukuruznog brašna

Hemijski sastav kukuruzne krupice i kukuruznog brašna dat je u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Hemijski sastav kukuruzne krupice i kukuruznog b rašna

<b>Komponenta</b>	<b>Kukuruzna krupica</b>	<b>Kukuruzno brašno</b>
Voda, %	13,10	17,34
Skrob, %	76,00	76,75
Proteini, %	6,54	6,35
Celuloza, %	1,09	1,28
Pepeo, %	0,39	0,70
Fosfor, %	0,0887	0,149
Cu, ppm	1,64	1,15
Zn, ppm	5,31	5,11
Mn, ppm	1,78	2,46
Fe, ppm	18,30	22,00
Ca, ppm	50,90	60,80
Na, ppm	41,70	33,40

Sadržaj skroba (polarimetrijska metoda) i vode (metoda sušenjem) određivani su na Tehnološko-metalurškom fakultetu, dok su sadržaji celuloze, proteina, pepela, fosfora, bakra, cinka, mangana, gvožđa, kalcijuma i natrijuma određivani standardnim metodama u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd. Sadržaj proteina je određivan kao sadržaj

azota metodom po Kjeldahl-u, pomnožen sa faktorom 6,25. Sadržaj celuloze je određivan metodom po Scharrer-Kürschner-u, a sadržaj pepela je određivan žarenjem na 550 °C. Sadržaj fosfora je određivan spektrofotometrijskom metodom, dok su sadržaji Cu, Zn, Mn, Fe, Ca i Na određivani atomskom apsorpcionom spektrometrijskom metodom (AAS).

### 5.1.2. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice pri različitim hidromodulima

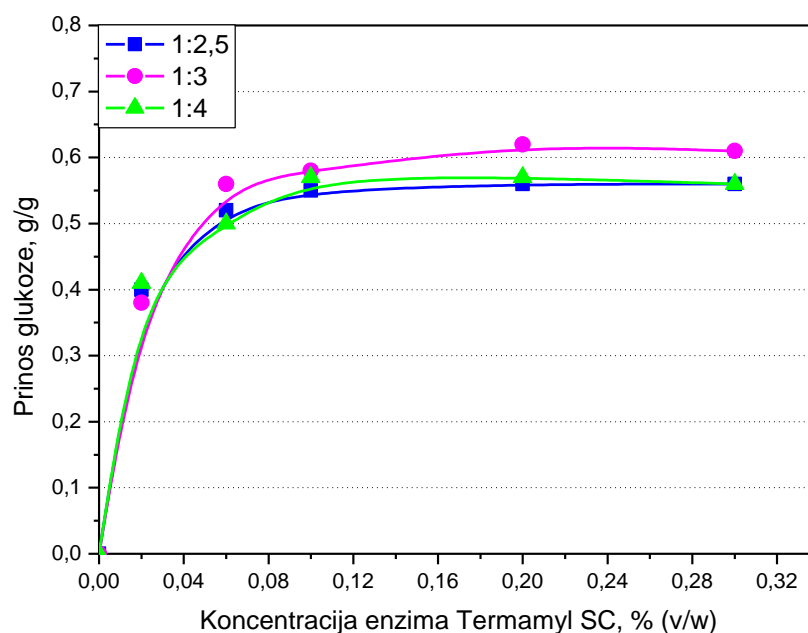
Ovaj set eksperimenata izvođen je u cilju određivanja uticaja koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice, pri različitim hidromodulima: 1:2,5, 1:3 i 1:4. Kukuruzna krupica sadrži 76,00% skroba (tabela 5.1.), pa hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4 odgovaraju početne koncentracije skroba od 217,14, 190,00 i 152,00 g/l, respektivno. Koncentracija enzima je izražena u % (ml enzima/100 g krupice). Nakon završene faze likvefakcije merena je koncentracija nastale glukoze, a rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 5.2. i na slici 5.1.

Tabela 5.2. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4

Konc. enzima Termamyl SC, % (v/w)	Konc. glukoze, g/l			Prinos glukoze, g/g <sup>a</sup>		
	1:2,5	1:3	1:4	1:2,5	1:3	1:4
<b>0,02</b>	88,12	72,62	62,86	0,40	0,38	0,41
<b>0,06</b>	112,45	107,22	76,20	0,52	0,56	0,50
<b>0,10</b>	118,76	111,00	86,08	0,55	0,58	0,57
<b>0,20</b>	122,56	117,18	86,78	0,56	0,62	0,57
<b>0,30</b>	121,45	115,66	85,55	0,56	0,61	0,56

Uslovi procesa su kao na slici 5.1.

<sup>a</sup>Prinos glukoze je izračunavan na osnovu jednačine (2)



Slika 5.1. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4. Uslovi procesa:  $t=85^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1$  h, brzina mešanja  $v=150$  rpm.

Iz tabele 5.2. i sa slike 5.1. može se videti da pri svakom hidromodulu sa povećanjem koncentracije enzima Termamyl SC dolazi do povećanja stepena hidrolize skroba, odnosno do povećanja koncentracije i prinosa nastale glukoze. Takođe se može uočiti da kod sva tri hidromodula primenom koncentracija enzima Termamyl SC viših od 0,10% (v/w) dobijaju se vrednosti koncentracije i prinosa glukoze relativno bliske, tako da dalje povećanje koncentracije enzima, van prikazanog opsega, ne bi značajno uticalo na promenu stepena hidrolize. Sa slike 5.1. može se videti da pri hidromodulu od 1:3 postižu se najviše vrednosti prinosa glukoze, dok se veoma bliske vrednosti ovog parametra postižu kod hidromodula 1:2,5 i 1:4. Zbog najviše početne koncentracije skroba u suspenziji kod hidromodula 1:2,5, očekivao bi se i najviši prinos glukoze, međutim veliki viskozitet suspenzije, problemi prilikom mešanja i inhibicija enzima visokom koncentracijom supstrata značajno utiču na smanjenje prinosa glukoze pri ovom hidromodulu. Može se takođe videti da je pri ovako visokim početnim koncentracijama skroba kao supstrata došlo i do inhibicije enzima proizvodom odnosno nastalom glukozom. U svom radu Kolusheva i Marinova [179] takođe uočavaju inhibiciju amilaze supstratom

(skrobom) pri njegovim visokim koncentracijama (iznad 250 g/l), kao i inhibiciju amilaze glukozom nastalom tokom hidrolize. Kako bi dokazali hipotezu o inhibitornom delovanju glukoze na hidrolizu skroba, istraživali su uticaj dodatka glukoze (do 0,1 mol/l) na tok hidrolize, i zaključili su da se sa povećanjem koncentracija dodate glukoze smanjuje brzina hidrolize skroba. Pojava inhibicije visokim koncentracijama supstrata i proizvoda takođe je uočena i u radu Yankov-a i saradnika [180].

### 5.1.3. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruznog brašna pri različitim hidromodulima

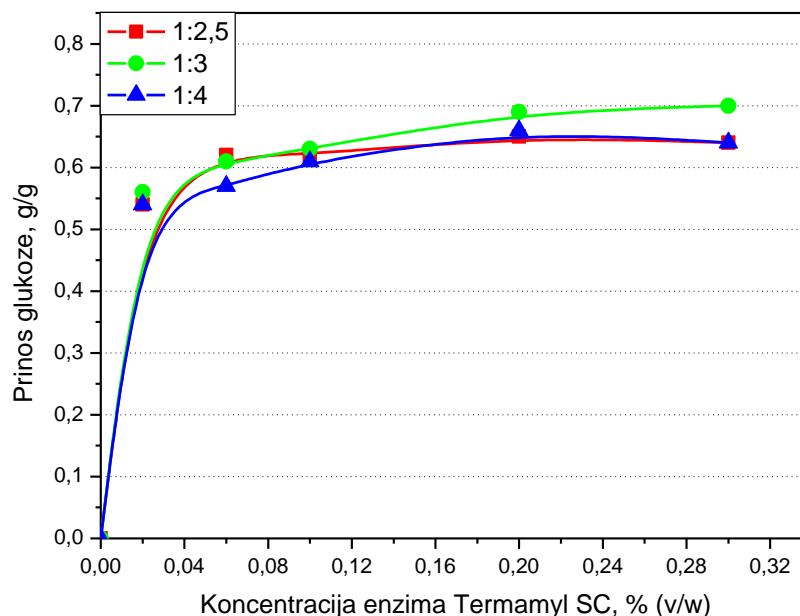
Ovaj set eksperimenata izvođen je radi određivanja uticaja koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruznog brašna, pri različitim hidromodulima: 1:2,5, 1:3 i 1:4. Kukuruzno brašno sadrži 76,75% skroba (tabela 5.1.), pa hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4 odgovaraju početne koncentracije skroba od 219,29, 191,87 i 153,50 g/l, respektivno. Koncentracija enzima je izražena u % (ml enzima/100 g brašna). Nakon završene faze likvefakcije merena je koncentracija nastale glukoze, a rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 5.3. i na slici 5.2.

Tabela 5.3. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4

Konc. enzima Termamyl SC, % (v/w)	Konc. glukoze, g/l			Prinos glukoze, g/g		
	1:2,5	1:3	1:4	1:2,5	1:3	1:4
<b>0,02</b>	118,94	107,22	83,39	0,54	0,56	0,54
<b>0,06</b>	136,66	117,54	87,29	0,62	0,61	0,57
<b>0,10</b>	136,90	120,74	94,16	0,62	0,63	0,61
<b>0,20</b>	143,76	132,26	100,75	0,65	0,69	0,66
<b>0,30</b>	141,78	135,12	98,78	0,64	0,70	0,64

Uslovi procesa su kao na slici 5.1.



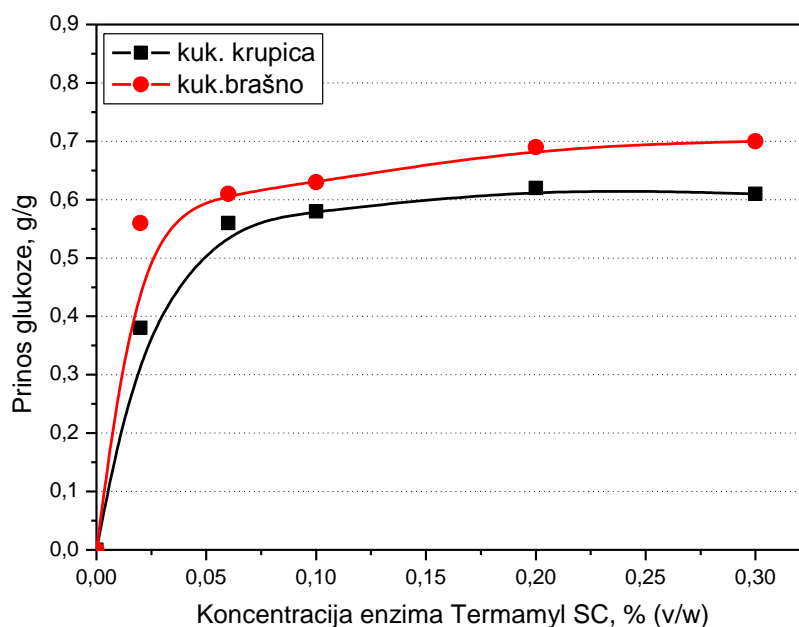


Slika 5.2. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4. Uslovi procesa su kao na slici 5.1.

Na osnovu tabele 5.3. i slike 5.2. može se videti da pri svakom hidromodulu sa povećanjem koncentracije enzima Termamyl SC dolazi do povećanja koncentracije i prinosa glukoze. Takođe se može uočiti da kod sva tri hidromodula pri koncentracijama enzima višim od 0,10% (v/w) ne dolazi do velikih promena u koncentraciji i prinosu nastale glukoze. Sa slike 5.2. može se uočiti da se pri hidromodulu od 1:3 postižu najviše vrednosti prinosa glukoze. Veoma bliske vrednosti ovog parametra postižu kod hidromodula 1:2,5 i 1:4, pri koncentracijama enzima višim od 0,10% (v/w). Zbog najviše početne koncentracije skroba u suspenziji kod hidromodula 1:2,5, očekivao bi se i najviši prinos glukoze, međutim veliki viskozitet suspenzije, problemi prilikom mešanja i inhibicija enzima visokom koncentracijom supstrata i nastalom glukozom značajno utiču na smanjenje prinosa glukoze pri ovom hidromodulu.

Poredeći vrednosti koncentracije i prinosa glukoze dobijenih likvefakcijom skroba iz dve različite sirovine, prikazanih u tabelama 5.2. i 5.3. i na slikama 5.1. i 5.2., može se uočiti da se znatno više vrednosti ovih parametara dobijaju kod kukuruznog brašna pri istom hidromodulu i istoj koncentraciji enzima Termamyl SC. Kao što je već napomenuto, najviše vrednosti koncentracije glukoze i prinosa glukoze kod obe sirovine postignute su

pri hidromodulu 1:3. Poređenje postignutih vrednosti prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri istom hidromodulu od 1:3 i sa različitim koncentracijama enzima Termamyl SC prikazano je na slici 5.3.



Slika 5.3. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu prinosa glukoze nakon likvefakcije skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3. Uslovi procesa su kao na slici 5.1.

#### **5.1.4. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri konstantnoj koncentraciji enzima Termamyl SC i različitim hidromodulima**

U ovim eksperimentima je ispitivan uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa nastale glukoze nakon završene dvojno-enzimske hidrolize (likvefakcije i saharifikacije) kukuruzne krupice i kukuruznog brašna, pri hidromodulima: 1:2,5, 1:3 i 1:4. Korišćena je konstantna vrednost koncentracije enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w). Dobijeni rezultati ispitivanja prikazani su u tabelama 5.4. i 5.5. i na slici 5.4.

Tabela 5.4. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4

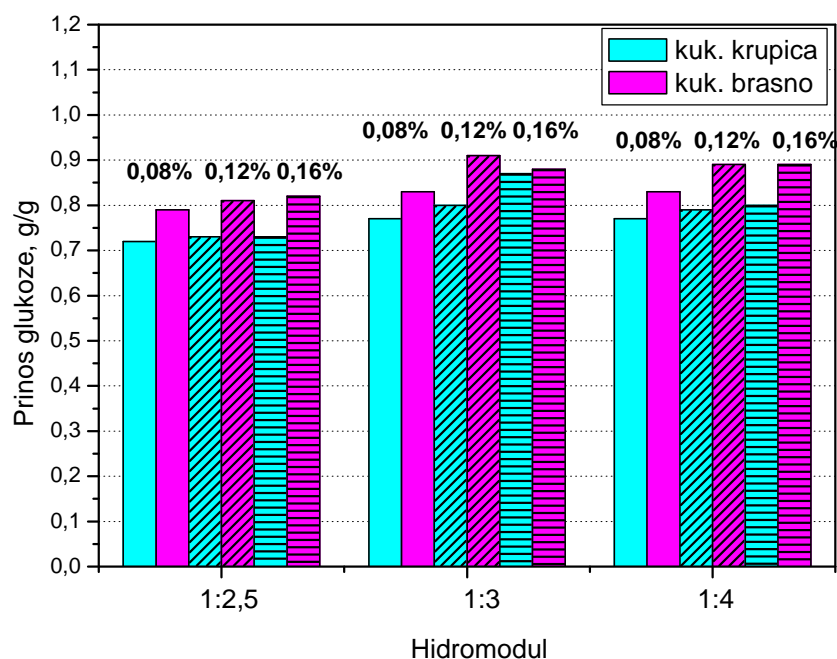
Konc. enzima SAN Extra L, % (v/w)	Koncentracija glukoze, g/l					
	Kukuruzna krupica			Kukuruzno brašno		
	1:2,5	1:3	1:4	1:2,5	1:3	1:4
0,08	156,27	145,65	117,68	172,56	159,37	127,68
0,12	158,75	152,78	120,66	177,05	174,81	136,66
0,16	158,75	166,07	121,35	179,29	168,07	136,66

Uslovi procesa su kao na slici 5.4.

Tabela 5.5. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu prinosa glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4

Konc. enzima SAN Extra L, % (v/w)	Prinos glukoze, g/g					
	Kukuruzna krupica			Kukuruzno brašno		
	1:2,5	1:3	1:4	1:2,5	1:3	1:4
0,08	0,72	0,77	0,77	0,79	0,83	0,83
0,12	0,73	0,80	0,79	0,81	0,91	0,89
0,16	0,73	0,87	0,80	0,82	0,88	0,89

Uslovi procesa su kao na slici 5.4.



Slika 5.4. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu prinosa glukoze nakon dvojnno-enzimske hidrolize skroba kukuruzne krupice i kukuruznog brašna pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4 i konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC. Uslovi procesa: likvefakcija -  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w); saharifikacija -  $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=4\text{ h}$ , brzina mešanja  $v=150\text{ rpm}$  (□ - 0,08%, ▨ - 0,12%, ▩ - 0,16% (v/w) SAN Extra L)

Iz rezultata prikazanih u tabelama 5.4. i 5.5. i na slici 5.4., može se videti da ukoliko se kao sirovine porede kukuruzno brašno i krupica, znatno više koncentracije i prinosi glukoze nakon završene enzimske hidrolize se postižu kod kukuruznog brašna pri istoj koncentraciji enzima Termamyl SC i SAN Extra L i istom hidromodulu. Isti slučaj je bio i u fazi likvefakcije, kao što je prikazano u tabelama 5.2. i 5.3. i na slikama 5.1., 5.2. i 5.3. Naime, značajan uticaj pri hidrolizi skroba imaju dimenzije čestica korišćenih sirovina. Veće dimenzije čestica kukuruzne krupice znatno smanjuju stepen hidrolize skroba, jer su povećana difuziona ograničenja i smanjena je kontaktna površina između čestica supstrata i rastvora enzima. Uticaj dimenzija čestica sirovine prikazan je i u radu Lazića i saradnika [73] koji su ispitivali hidrolizu skroba krompira primenom enzima Termamyl 120L i Supersan 240L, u cilju dobijanja etanola. U svojim rezultatima su pokazali da se pri konstantnoj koncentraciji enzima Termamyl 120L, sa povećanjem dimenzija čestica, stepen hidrolize skroba i dekstrozni ekvivalent smanjuju. Takođe, u ovoj

disertaciji nepovoljan aspekt primene kukuruzne krupice je i nešto niži sadržaj skroba nego u brašnu (tabela 5.1.), što podrazumeva i niži sadržaj krajnjeg proizvoda etanola. Iz navedenih razloga, i na osnovu prikazanih rezultata (tabele 5.2.-5.5. i slike 5.1.-5.4.) u narednim eksperimentima kao sirovina korišćeno je kukuruzno brašno.

Dalje je neophodno izabrati optimalan hidromodul kod enzimske hidrolize kukuruznog brašna. Na osnovu tabela 5.4. i 5.5. i slike 5.4. može se videti da kao i kod faze likvefakcije, najviše koncentracije i prinosi glukoze nakon saharifikacije se dobijaju pri hidromodulu 1:3, a najniže koncentracije glukoze pri hidromodulu 1:2,5. Naime, pri hidromodulu 1:2,5 je najviša početna koncentracija supstrata, ali usled velikog viskoziteta, problema prilikom mešanja (stvaranja grudvica) i inhibicije enzima supstratom i proizvodom dobijaju se značajno niže vrednosti koncentracije i prinosa glukoze od očekivanih. Pri hidromodulu 1:4 nije došlo do pojave inhibicije enzima supstratom, a mešanje je znatno olakšano usled smanjenog viskoziteta suspenzije. Međutim, zbog niske početne koncentracije skroba postignute su i niske vrednosti koncentracije i prinosa glukoze (niže nego kod hidrolize pri hidromodulu 1:3).

Početna koncentracija supstrata ima značajan uticaj na efekte i hidrolize i fermentacije. Sa aspekta ekonomike procesa poželjno je da se ostvari što je moguće veća konverzija skroba putem enzimske hidrolize, kao i da se koristi viša početna koncentracija supstrata jer se time smanjuje reaktorska zapremina i povećava se zapreminska produktivnost reaktora [92]. Međutim, s druge strane smatra se da je hidroliza skroba efikasnija pri nižim koncentracijama skroba (enzimi potpunije razgrađuju skrob u rastvorima sa manjom koncentracijom) i sprečava se mogućnost pojave inhibicije enzima supstratom [73]. Lazić i saradnici [73] su utvrdili da ukoliko se hidromodul poveća sa 1:1,05 na samo 1:1, maksimalni dekstrozni ekvivalent se uveća sa 40,9% na 51,2%. Arasaratnam i saradnici [181] su u svom radu postigli slabiju hidrolizu skroba kukuruznog brašna sa visokim početnim koncentracijama skroba. Tako npr. hidrolizom 16% suspenzije kukuruznog brašna postigli su prinos glukoze od 76%, a hidrolizom 40% suspenzije ostvarili su svega 50,2% glukoze. Koncentrovanije suspenzije kukuruznog brašna pokazuju i lošije filtracione karakteristike, a usled povećanog viskoziteta javljaju se i problemi sa mešanjem. Takođe je utvrđeno da se sa povećanjem sadržaja suve materije u suspenziji kukuruznog brašna povećava i formiranje sporednih proizvoda hidrolize (uglavnom izomaltoze i izomaltotrioze) [92]. Na osnovu ostvarenih koncentracija i prinosa glukoze

nakon hidrolize kukuruznog brašna pri ispitivanim hidromodulima (tabele 5.3.-5.5. i slike 5.2. i 5.4.) i izloženih ekonomskih razmatranja, izabran je optimalni hidromodul od 1:3 kojem odgovara početna koncentracija skroba od 191,87 g/l.

#### **5.1.5. Određivanje optimalne koncentracije enzima Termamyl SC u fazi likvefakcije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3**

U cilju određivanja optimalne koncentracije enzima Termamyl SC (odnosno optimalnog stepena likvefakcije skroba kukuruznog brašna koji je potreban da bi se ostvarili dobri efekti u sledećem stepenu hidrolize – saharifikaciji) izvođena je dvojno-enzimska hidroliza pri čemu su korišćene različite koncentracije enzima Termamyl SC i konstantna koncentracija enzima SAN Extra L od 0,08% (v/w), pri hidromodulu 1:3 koji je izabran kao optimalan u prethodnim eksperimentima. Nakon završene dvojno-enzimske hidrolize određivani su sledeći parametri: koncentracija nastale glukoze, dekstrozni ekvivalent, prinos glukoze i procenat od teorijske koncentracije glukoze. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 5.6. i na slici 5.5.

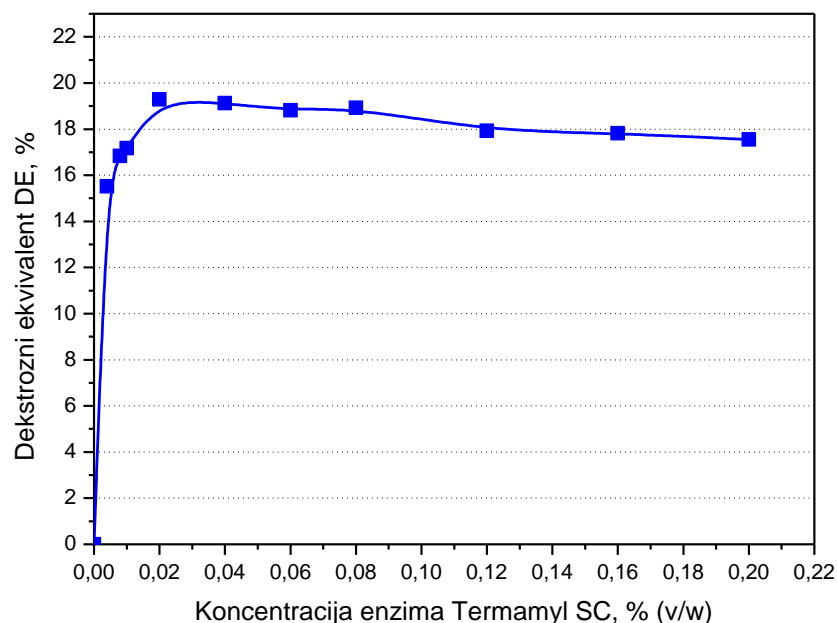
Tabela 5.6. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije glukoze, dekstroznog ekvivalenta, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna pri konstantnim vrednostima koncentracije enzima SAN Extra L i hidromodula.

<b>Konc. enzima Termamyl SC, % (v/w)</b>	<b>Koncentracija glukoze, g/l</b>	<b>Dekstrozni ekvivalent DE, %<sup>b</sup></b>	<b>Prinos glukoze, g/g</b>	<b>Procent od teor. konc. glukoze, %<sup>c</sup></b>
0,004	128,27	15,52	0,67	60,17
0,008	139,19	16,84	0,72	65,29
0,010	141,89	17,17	0,74	66,56
0,020	159,37	19,28	0,83	74,76
0,040	158,05	19,12	0,82	74,14
0,060	155,51	18,81	0,81	72,95
0,080	156,39	18,92	0,81	73,36
0,120	148,22	17,93	0,77	69,53
0,160	147,30	17,82	0,77	69,10
0,200	145,07	17,55	0,76	68,05

Uslovi procesa su isti kao na slici 5.5.

<sup>b</sup> DE je izračunavan na osnovu jednačine (3)

<sup>c</sup> % od teor. konc. glukoze je izračunavan na osnovu jednačina (4) i (5)



Slika 5.5. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu dekstroznog ekvivalenta nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna pri konstantnim vrednostima koncentracije enzima SAN Extra L i hidromodula. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, brzina mešanja  $v=150$  rpm, likvefakcija -  $t=85$  °C,  $pH=6$ ,  $\tau=1$  h; saharifikacija -  $t=55$  °C,  $pH=5$ ,  $\tau=4$  h,  $c$  (SAN Extra L) = 0,08% (v/w).

Na osnovu tabele 5.6. i slike 5.5. može se uočiti da pri koncentraciji enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) dolazi do naglog povećanja svih prikazanih procesnih parametara nakon završene dvojno-enzimske hidrolize, a ujedno i dostizanja njihovih maksimalnih vrednosti. Ukoliko se koriste koncentracije enzima Termamyl SC između 0,02 i 0,08% (v/w) postižu se vrednosti svih parametara veoma bliske, a pri koncentracijama enzima višim od 0,08% (v/w) dolazi i do određenog pada vrednosti ovih procesnih parametara nakon završene dvojno-enzimske hidrolize. Slične rezultate postigli su Apar i Özbek [182] prilikom izvođenja likvefakcije kukuruznog skroba pomoću  $\alpha$ -amilaze iz *Bacillus* sp. Ispitivajući uticaj koncentracije amilaze na stepen hidrolize, utvrdili su da se najveća brzina hidrolize postiže pri koncentraciji amilaze od 1,6 g/l. Takođe, koristeći koncentracije enzima u opsegu 1,6-2,0 g/l utvrdili su da ne dolazi do promene u brzini hidrolize, što objašnjavaju saturacijom granula skroba sa aktivnim molekulima enzima. Apar i Özbek [182] i Textor i saradnici [183] ovu pojavu objašnjavaju jednom



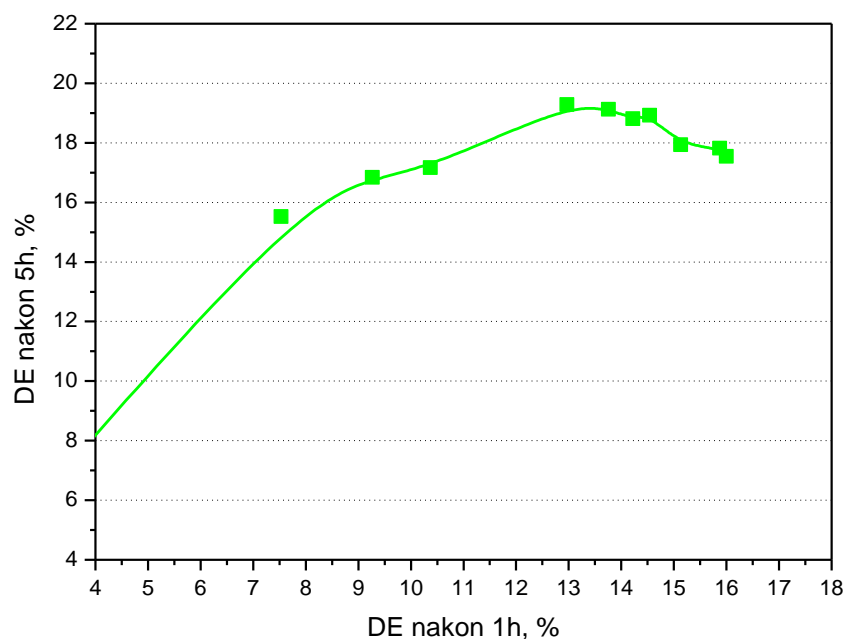
vrstom tzv. enzim-enzim inhibicije koja dovodi do smanjene mogućnosti aktivnih centara enzima da se efikasno vežu za čestice skroba.

U cilju utvrđivanja optimalne koncentracije enzima Termamyl SC neophodno je i ispitati kako dekstrozni ekvivalent postignut nakon faze likvefakcije (1 h hidrolize) utiče na dekstrozni ekvivalent nakon završene obe faze hidrolize (5 h hidrolize) skroba kukuruznog brašna. Rezultati su prikazani u tabeli 5.7. i na slici 5.6.

Tabela 5.7. Uticaj dekstroznog ekvivalenta hidrolizata iz faze likvefakcije na dekstrozni ekvivalent hidrolizata nakon faze saharifikacije pri konstantnim vrednostima koncentracije enzima SAN Extra L i hidromodula, a različitim koncentracijama enzima Termamyl SC

<b>Konc. enzima Termamyl SC, % (v/w)</b>	<b>DE (1h), %</b>	<b>DE (5h), %</b>
0,004	7,53	15,52
0,008	9,27	16,84
0,010	10,37	17,17
0,020	12,97	19,28
0,040	13,76	19,12
0,060	14,22	18,81
0,080	14,54	18,92
0,120	15,13	17,93
0,160	15,87	17,82
0,200	16,00	17,55

Uslovi procesa su isti kao na slici 5.5.



Slika 5.6. Uticaj dekstroznog ekvivalenta hidrolizata iz faze likvefakcije na dekstrozni ekvivalent hidrolizata nakon faze saharifikacije pri konstantnom hidromodulu i koncentraciji enzima SAN Extra L i različitim koncentracijama enzima Termamyl SC. Uslovi procesa su isti kao na slici 5.5.

U tabeli 5.7. i na slici 5.6. može se videti da se maksimalna vrednost dekstroznog ekvivalenta od 19,28 nakon faze saharifikacije postiže ukoliko se koristi koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) u fazi likvefakcije. Takođe se može uočiti da sa povećanjem dekstroznog ekvivalenta u fazi likvefakcije iznad DE~13, dolazi do smanjenja dekstroznog ekvivalenta nakon faze saharifikacije. Slične rezultate su postigli Bebić i saradnici [184] koji su izvodili hidrolizu kukuruznog skroba pomoću enzima Termamyl 120L i AMG 150L. U njihovim ispitivanjima optimalna vrednost DE nakon likvefakcije se kretala u opsegu 15-18 u zavisnosti od procesnih uslova. Takođe, u svom radu Aiyer [185] preporučuje da optimalna vrednost DE na kraju likvefakcije bude u intervalu od 10-20.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama 5.6. i 5.7. i na slikama 5.5. i 5.6., može se usvojiti da je optimalna koncentracija enzima Termamyl SC za fazu likvefakcije 0,02% (v/w), pri kojoj se postižu i najbolji efekti u sledećoj fazi hidrolize (saharifikaciji). Pri optimizaciji koncentracije enzima mora se voditi računa i o činjenici da je cena enzima bitan deo ukupnih troškova procesa, te u značajnoj meri utiče na rentabilnost procesa. U literaturi se mogu naći relativno slične vrednosti za optimalnu koncentraciju enzima

Termamyl u fazi likvefikacije kukuruznog skroba. Montesinos i Navarro [186] su u cilju proizvodnje etanola iz pšeničnog brašna izvodili hidrolizu koristeći 0,02% (v/w skroba) enzima Termamyl 120L. Međutim, Xu i saradnici [187] u fazi likvefikacije skroba kukuruznog brašna koriste koncentraciju  $\alpha$ -amilaze od 0,05% (v/w brašna), što je duplo viša vrednost od optimalne vrednosti koncentracije amilaze dobijene u ovoj disertaciji. Naime, potrebno je naglasiti da se u većini naučno-istraživačkih radova u fazi likvefikacije skroba koristi amilaza Termamyl 120L, koja je znatno manje aktivnosti od amilaze Termamyl SC. Firma „Novozymes“ (Danska) je u skorije vreme plasirala na tržištu enzim Termamyl SC upravo radi korišćenja u sintezi bioetanola, i koji zbog svoje veće aktivnosti obezbeđuje efikasniju enzimsku hidrolizu.

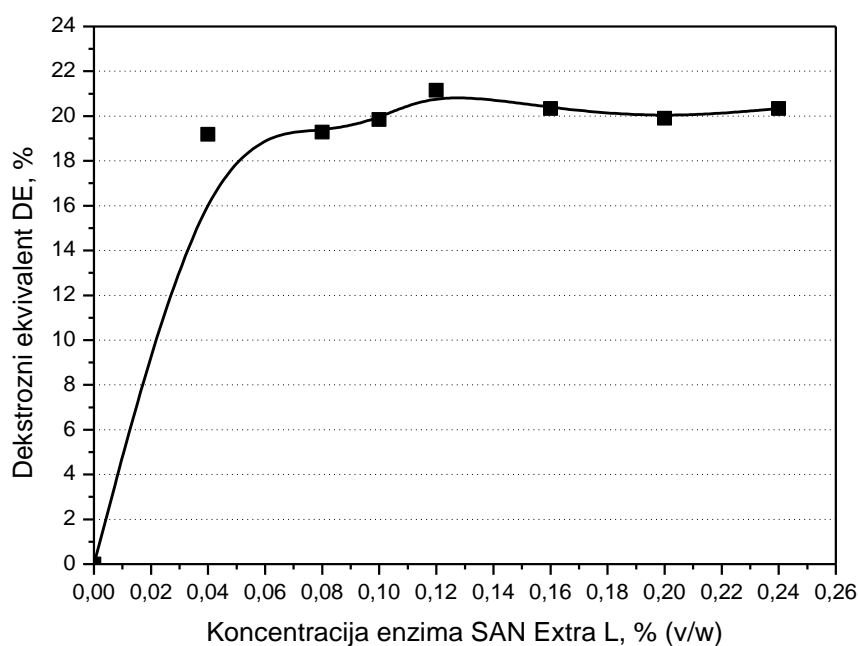
#### **5.1.6. Određivanje optimalne koncentracije enzima SAN Extra L u fazi saharifikacije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3**

Sledeći set eksperimenata vršen je u cilju određivanja optimalne koncentracije enzima SAN Extra L u fazi saharifikacije skroba kukuruznog brašna. Dvojno-enzimska hidroliza je izvođena pri optimalnim vrednostima koncentracije enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i hidromodula od 1:3, a koji su određeni u prethodnim eksperimentima, dok su varirane koncentracije enzima SAN Extra L. Nakon završene dvojno-enzimske hidrolize određivani su sledeći parametri: koncentracija nastale glukoze, dekstrozni ekvivalent, prinos glukoze i procenat od teorijske koncentracije glukoze. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 5.8. i na slici 5.7.

Tabela 5.8. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije glukoze, dekstroznog ekvivalenta, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna pri konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC i hidromodula

Konc. enzima SAN Extra L, % (v/w)	Koncentracija glukoze, g/l	Dekstrozni ekvivalent DE, %	Prinos glukoze, g/g	Procentat od teor. konc. glukoze, %
0,04	158,65	19,19	0,83	74,42
0,08	159,37	19,28	0,83	74,76
0,10	164,03	19,84	0,85	76,95
0,12	174,81	21,15	0,91	82,00
0,16	168,07	20,33	0,88	78,84
0,20	164,48	19,90	0,86	77,16
0,24	168,07	20,33	0,88	78,84

Uslovi procesa su kao na slici 5.7.



Slika 5.7. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu dekstroznog ekvivalenta nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna pri konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC i hidromodula. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, brzina mešanja  $v=150$  rpm; likvefakcija -  $t=85$  °C,  $pH=6$ ,  $\tau=1$  h,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w); saharifikacija -  $t=55$  °C,  $pH=5$ ,  $\tau=4$  h.

Iz tabele 5.8. i sa slike 5.7. može se videti da se najviša vrednost procesnih parametara nakon dvojno-enzimske hidrolize postiže pri koncentraciji enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w), i to: koncentracija glukoze od 174,81 g/l, dekstrozni ekvivalent od 21,15, prinos glukoze od 0,91 g/g i procenat od teorijske koncentracije glukoze od 82,00%. Ova koncentracija enzima SAN Extra L usvaja se kao optimalna vrednost za fazu saharifikacije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3. U svom radu Xu i saradnici [187] postigli su vrlo blisku optimalnu vrednost za koncentraciju glukoamilaze koja je iznosila 0,15% (v/w).

Iz tabele 5.8. može se takođe videti da se korišćenjem optimalnih koncentracija enzima Termamyl SC i SAN Extra L postiže visok stepen konverzije skroba nakon završene hidrolize, odnosno visok prinos glukoze od 0,91 g/g, što se može porediti i sa objavljenim rezultatima drugih istraživača. Arasaratnam i saradnici [181] su na kraju hidrolize kukuruznog brašna postigli niži prinos glukoze od 0,76 koristeći slične koncentracije amilaze i glukoamilaze. Određene razlike u rezultatima postoje usled različitog hemijskog sastava i početne koncentracije supstrata. Dettori-Campus i saradnici [188] su ispitivali hidrolizu granula skroba iz različitih žitarica koristeći amilazu iz *Bacillus stearothermophilus*, i postigli su stepen konverzije do 80% u zavisnosti od korišćene sirovine, što je blisko rezultatima u ovoj disertaciji (tabela 5.7.). Veoma efikasnu konverziju kukuruznog skroba (preko 96%) postigli su i Karakastanis i Liakopoulou-Kyriakides [189] simultanim dejstvom amilaze i glukoamilaze ali tek nakon 24 h hidrolize.

### 5.1.7. Kinetika dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna

Na osnovu prethodnih rezultata usvojeni su sledeći optimalni parametri za dvojno-enzimsku hidrolizu skroba kukuruznog brašna: hidromodul 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w). Ove vrednosti hidromodula i koncentracija enzima korišćene su u narednim eksperimentima prilikom ispitivanja alkoholne fermentacije.

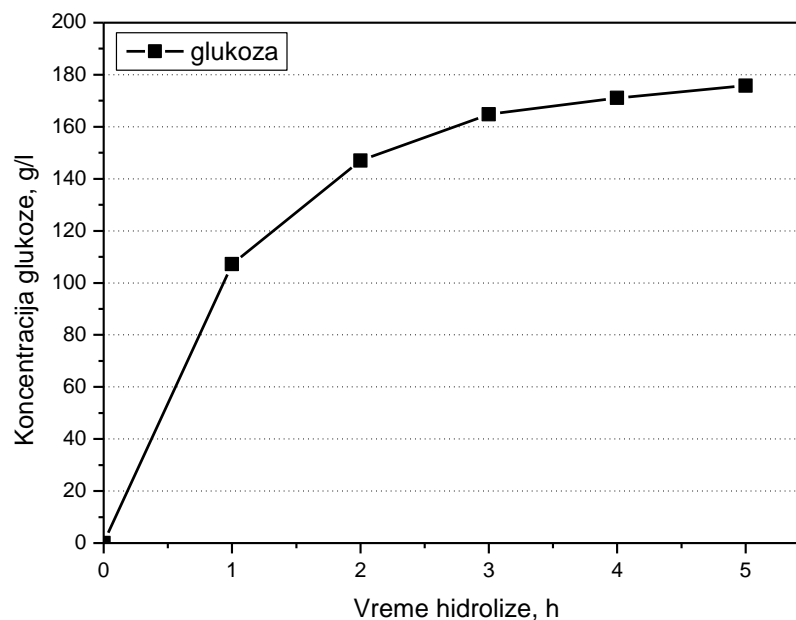
U ovom eksperimentu su praćene promene koncentracije glukoze, dekstroznog ekvivalenta, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze tokom dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna, koja je izvođena pri optimalnim

vrednostima koncentracija enzima i hidromodula. Koncentracija glukoze merena je na svakih sat vremena u toku 5 h dvojno-enzimske hidrolize, a rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 5.9. i na slici 5.8.

Tabela 5.9. Promena koncentracije glukoze, dekstroznog ekvivalenta, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze tokom dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna.

Vreme, h	Koncentracija glukoze, g/l	Dekstrozni ekvivalent DE, %	Prinos glukoze, g/g	Procentat od teor. konc. glukoze, %
1	107,22	12,97	0,56	50,30
2	147,03	17,79	0,77	68,97
3	164,78	19,93	0,86	77,30
4	171,06	20,69	0,89	80,26
5	174,81	21,15	0,91	82,00

Uslovi procesa kao na slici 5.8.



Slika 5.8. Tok dvojno-enzimske hidrolize skroba kukuruznog brašna pri optimalnim vrednostima procesnih parametara. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, brzina mešanja  $v=150$  rpm, likvefakcija -  $t=85$  °C,  $pH=6$ ,  $\tau=1$  h,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w); saharifikacija -  $t=55$  °C,  $pH=5$ ,  $\tau=4$  h,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w).

## 5.2. ALKOHOLNA FERMENTACIJA HIDROLIZATA KUKURUZNOG BRAŠNA

### 5.2.1. Ispitivanje fermentativne sposobnosti različitih vrsta kvasaca na hidrolizatu kukuruznog brašna

U toku 48 h alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna ispitivana je fermentativna sposobnost sledećih vrsta kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* i *Schizosaccharomyces pombe*. Početna koncentracija glukoze u hidrolizatu iznosila je 114,71 g/l i dobijena je razblaživanjem hidrolizata koncentracije 174,81 g/l. Proračun razblaženja izvršen je prema jednačinama (6)-(8). Količina inokuluma je iznosila 2% (v/v). Fermentativna aktivnost praćena je određivanjem sadržaja etanola i koncentracije glukoze nakon 24 i 48 h alkoholne fermentacije. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 5.10. i na slici 5.9.

Tabela 5.10. Rezultati ispitivanja fermentativne sposobnosti različitih vrsta kvasaca na hidrolizatu kukuruznog brašna

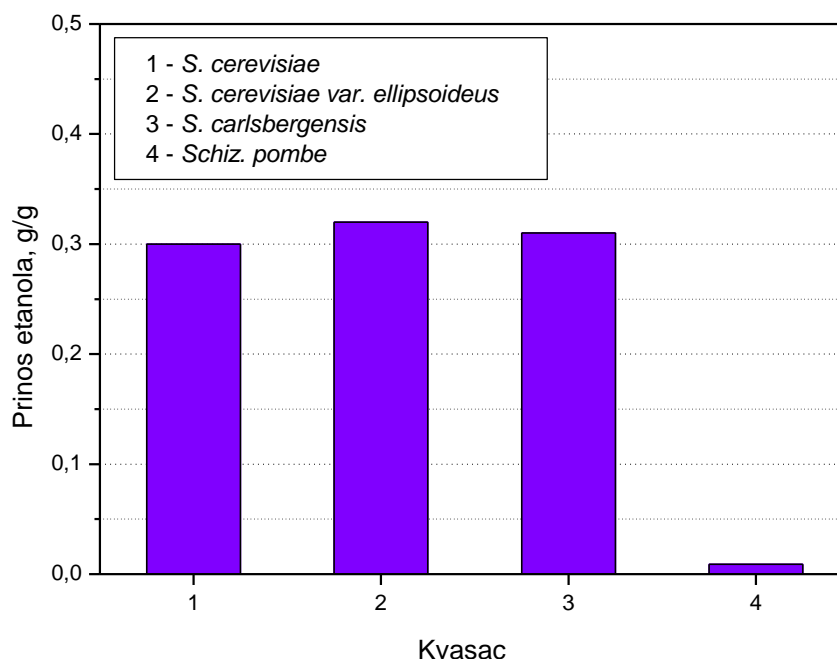
Parametar	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. ellipsoideus</i>	<i>S. carlsbergensis</i>	<i>Schiz. pombe</i>
	<b>24 h</b>			
Koncentracija glukoze, g/l	37,92	19,97	39,31	123,69
Sadržaj etanola, % (w/w)	3,86	3,94	4,13	0,34
Prinos etanola $Y_{PS}$ , g/g <sup>d</sup>	0,20	0,20	0,21	0,018
Procenat od teor. sadrž. etanola, % <sup>e</sup>	35,51	36,25	37,99	3,13
Vol. produktivnost, g/l·h <sup>f</sup>	1,62	1,64	1,72	0,14
	<b>48 h</b>			
Koncentracija glukoze, g/l	6,50	5,61	6,10	134,17
Sadržaj etanola, % (w/w)	5,76	6,19	5,91	0,18
Prinos etanola $Y_{PS}$ , g/g	0,30	0,32	0,31	0,009
Procenat od teor. sadrž. etanola, %	52,99	56,95	54,37	1,65
Vol. produktivnost, g/l·h	1,20	1,29	1,23	0,04

Uslovi procesa kao na slici 5.9.

<sup>d</sup> Prinos etanola  $Y_{PS}$  je izračunavan prema jednačini (9)

<sup>e</sup> % od teor. sadrž. etanola je izračunavan prema jednačinama (10) i (11)

<sup>f</sup> Volumetrijska produktivnost je izračunavan prema jednačini (12)



Slika 5.9. Prinos etanola nakon alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa različitim vrstama kvasaca. Uslovi procesa: likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w); saharifikacija -  $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=4\text{ h}$ ,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w), brzina mešanja  $v=150\text{ rpm}$ ; fermentacija -  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=48\text{ h}$  2% (v/v) inokuluma, početna koncentracija glukoze u hidrolizatu 114,71 g/l.

Na osnovu tabele 5.10. i slike 5.9 može se videti da su najviše vrednosti sadržaja etanola, prinosa etanola, procenta od teorijskog sadržaja etanola i volumetrijske produktivnosti nakon 48 h fermentacije postignute kod kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Kod kvasaca *S. cerevisiae* i *S. carlsbergensis* ostvarene su veoma visoke vrednosti ovih parametara, dok je *Schizosaccharomyces pombe* pokazao dosta loše fermentativne karakteristike dajući veoma niske vrednosti procesnih parametara nakon 24 i 48 h sati fermentacije. Okunowo and Osuntoki [190] su takođe postigli najveću proizvodnju etanola koristeći kvasac *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u fermentaciji vina, u poređenju sa proizvodnjom etanola postignutom sa *S. cerevisiae* i *S. carlsbergensis*.

Među testiranim vrstama kvasaca, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* je pokazao najbolje fermentativne karakteristike, pa je korišćen u svim daljim ispitivanjima kao proizvodni mikroorganizam.



### 5.2.2. Karakterizacija proizvodnog mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*

U cilju ispitivanja optimalnih uslova vođenja procesa alkoholne fermentacije neophodno je izvršiti karakterizaciju kvasca. Ispitana je sposobnost preživljavanja kvasca na različitim pH vrednostima podloge, kao i uticaj različitih koncentracija glukoze i etanola na rast kvasca. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Uticaj različitih pH vrednosti i koncentracija glukoze i etanola na rast kvasca

pH		Glukoza, %		Etanol, %	
5,25	+	5	+	5	+
4,77	+	10	+	6	+
3,79	+	15	+	7	+
3,00	+	20	+	8	+
2,50	+	25	+	9	+
2,00	-			10	-
				15	-
				20	-
				25	-

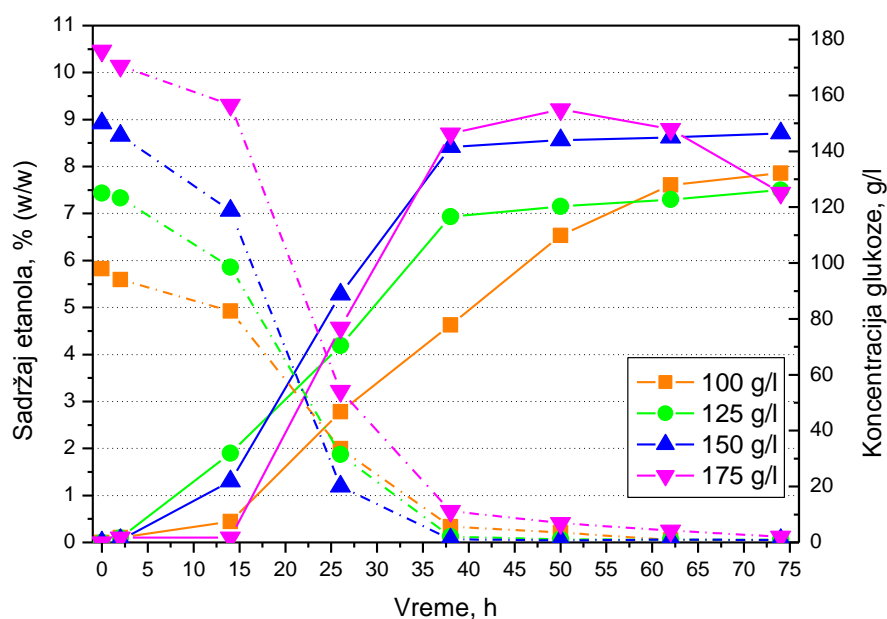
Kultura kvasca je zasejavana u dva pasaža u slanom bujonu, gde je sa (+) označen rast nakon drugog pasaža, a sa (-) izostanak rasta.

Iz tabele 5.11. može se videti da ćelije kvasca pokazuju rast u opsegu pH vrednosti 2,50-5,25, dok pri pH vrednosti 2,00 u drugom pasažu nije uočen rast. Striklovanjem kulture registrovano je preživljavanje ćelija, ali ne i njihov rast. Rast ćelija je dokazan na podlogama koje su sadržale glukoze od 5-25% i etanol od 5-9%. Pri vrednostima etanola većim od 10% dolazi do zaustavljanja rasta ćelija kvasca. Iako pri ovom sadržaju etanola nema rasta, ćelije kvasca su i dalje žive, ali neaktivne, što ukazuje na to da se maksimalni sadržaj etanola koji se može postići tokom fermentacije sa ovom vrstom kvasca kreće između 9 i 10%. Koncentracije od 15, 20 i 25% etanola u podlozi dovode do brzog odumiranja ćelija kvasca.

### **5.2.3. Alkoholna fermentacija sa slobodnim ćelijama kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus***

#### **5.2.3.1. Uticaj početne koncentracije glukoze na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri konstantnoj količini inokuluma**

Alkoholna fermentacija zavisi od različitih faktora, kao što su početna koncentracija glukoze, količina inokuluma, vreme neophodno da se postigne efikasna fermentacija itd. Prvi set eksperimenata je vođen u cilju određivanja optimalne početne koncentracije glukoze za proces alkoholne fermentacije. Izvršeno je ispitivanje promene sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija tokom fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri različitim početnim koncentracijama glukoze: 100, 125, 150 i 175 g/l. Hidrolizati sa početnim koncentracijama glukoze od 100, 125 i 150 g/l dobijeni su razblaživanjem hidrolizata koncentracije od 175 g/l (koji je dobijen primenom optimalnih koncentracija enzima Termamyl SC i SAN Extra L) preko proračuna razblaženja (jednačine (6)-(8)). Fermentacija je praćena tokom 74 h, a uzorci su analizirani nakon 2, 14, 26, 38, 50, 62 i 74 h. Količina inokuluma iznosila je 2% (v/v), što odgovara početnom broju ćelija kvasca od  $\sim 2 \cdot 10^5$  CFU/ml. Dvojno-enzimska hidroliza je izvođena pri optimalnim koncentracijama enzima Termamyl SC (0,02% v/w) i San Extra L (0,12% v/w) i optimalnom hidromodulu od 1:3 koji su određeni u prethodnim eksperimentima. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 5.12. i na slikama 5.10. i 5.11.

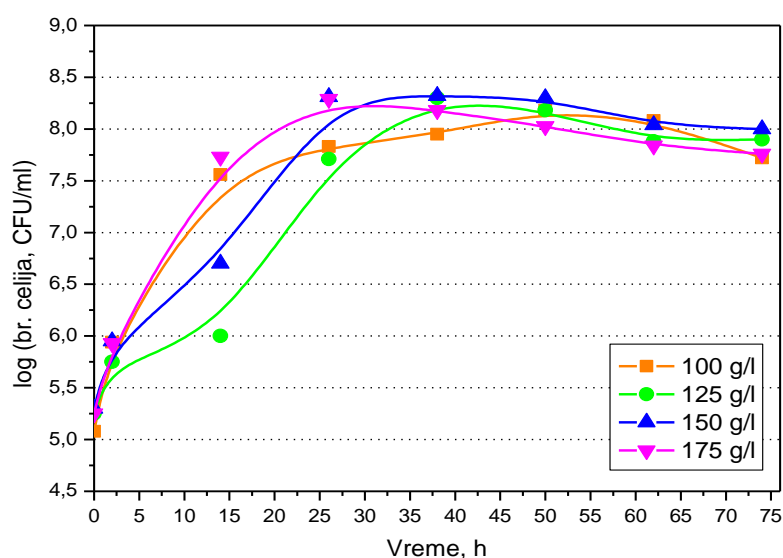


Slika 5.10. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze tokom fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Uslovi procesa: likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$  (v/w); saharifikacija -  $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=4\text{ h}$ ,  $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$  (v/w), brzina mešanja  $v=150\text{ rpm}$ ; fermentacija -  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ , količina inokuluma  $2\%$  (v/v). Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.

Sa slike 5.10. može se videti da je maksimalan sadržaj etanola, preko  $9\%$  (w/w), postignut pri početnoj koncentraciji glukoze od  $175\text{ g/l}$  u  $50\text{ h}$  fermentacije. Međutim, pri ovoj početnoj koncentraciji glukoze zapažena je inhibicija supstratom na početku alkoholne fermentacije. Poznato je da visoke koncentracije supstrata mogu izazvati osmotski šok kod ćelija kvasca i na taj način usporiti prenos mase i toplote. Dalje tokom fermentacije, tačnije nakon  $50\text{ h}$ , došlo je i do inhibicije kvasca proizvodom usled akumulacije etanola, s obzirom da je maksimalni sadržaj etanola od  $9,22\%$  (w/w) postignut nakon  $50\text{ h}$ , a zatim je smanjen na  $7,44\%$  (w/w) nakon  $74\text{ h}$  fermentacije. Maksimalna koncentracija etanola na kraju fermentacije postignuta je pri početnoj koncentraciji glukoze od  $150\text{ g/l}$  (bez pojave inhibicije supstratom i proizvodom) i iznosila je  $8,71\%$  (w/w), dok su znatno niže vrednosti sadržaja etanola dobijene pri početnim koncentracijama glukoze od  $100$  i  $125\text{ g/l}$ . Na slici 5.10. može se videti da je iskorišćenje šećera od strane kvasca skoro završeno već posle  $38\text{ h}$  fermentacije. Međutim, kod početne koncentracije glukoze od  $175\text{ g/l}$  potrošnja glukoze tokom fermentacije je najsporija, usled inhibicije supstratom i

proizvodom. Rezultati potrošnje glukoze su u skladu sa rezultatima proizvodnje etanola tokom fermentacije, s obzirom na to da kvasac koristi glukozu kao izvor ugljenika.

Thatipamala i saradnici [191] su objavili da je inhibicija supstratom i proizvodom značajno uticala na prinos etanola i biomase tokom alkoholne fermentacije. Oni su zaključili da prinos biomase kvasca *S. cerevisiae* opada od 0,156 do 0,026 kada koncentracija etanola raste od 0 do 107 g/l. Njihovi rezultati koji se odnose na inhibiciju supstratom su u skladu sa rezultatima prikazanim na slici 5.10., s obzirom da se inhibicija supstratom javila pri početnoj koncentraciji glukoze višoj od 150 g/l. Slično, u eksperimentima istraživača Ozmihci and Kargi [192] ispitivana je proizvodnja etanola iz surutke pri različitim koncentracijama supstrata i biomase. U njihovom radu, koncentracija nastalog etanola je rasla pri porastu koncentracije supstrata do 156 g/l. Dalje povećanje koncentracije supstrata iznad 156 g/l rezultovalo je u postepenom opadanju sadržaja etanola ukazujući na pojavu inhibicije supstratom. Siqueira i saradnici [193] su takođe objavili da visoke koncentracije supstrata inhibiraju rast kvasca tokom šaržne proizvodnje etanola iz sojine melase. Bebić i saradnici [184] su tokom fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pomoću *S. cerevisiae* postigli manje prinose etanola nakon 48 h u poređenju sa rezultatima u ovoj disertaciji (prinos etanola se kretao od 0,32 do 0,41 g/g sa početnim koncentracijama etanola od 85 do 250 g/l).



Slika 5.11. Promena broja ćelija kvasca u toku fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Uslovi procesa kao na slici 5.10.

Sa slike 5.11. se može videti da ćelije kvasca najranije ulaze u stacionarnu fazu rasta, a potom i najbrže odumiru, pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l (usled inhibicije supstratom i proizvodom). Pri najnižoj početnoj koncentraciji glukoze od 100 g/l ćelije najkasnije ulaze u stacionarnu fazu, oko 50 h fermentacije. Najsporije odumiru ćelije kvasca u hidrolizatu sa početnom koncentracijom glukoze od 150 g/l što ukazuje na to da bi pri kraju fermentacije upravo ove ćelije postigle najviši prinos etanola. Trend rasta broja ćelija je u skladu i sa porastom sadržaja etanola prikazanim na slici 5.10. Na kraju fermentacije, nakon 74 h, maksimalan broj ćelija od  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml postiže se pri početnoj koncentraciji glukoze od 150 g/l, što predstavlja promenu broja ćelija od 2,7 logaritamskih jedinica u odnosu na početan broj.

Uzimajući u obzir ekonomiku samog procesa, poželjno je da se postigne što viši sadržaj etanola tokom fermentacije kako bi se smanjili troškovi destilacije etanola, a time i ukupni troškovi proizvodnje etanola [19]. Troškovi proizvodnje mogu se značajno smanjiti i smanjenjem dužine trajanja alkoholne fermentacije. U cilju određivanja optimalne dužine trajanja fermentacije izvršena je procena osnovnih parametara, kao što su sadržaj etanola, prinos etanola, procenat od teorijskog sadržaja etanola, volumetrijska produktivnost i potrošnja glukoze, nakon 26, 38 i 74 h fermentacije pri početnoj koncentraciji glukoze od 150 g/l (tabela 5.12.). Maksimalne vrednosti ovih procesnih parametara postignute su kada je početna koncentracija glukoze iznosila 150 g/l (slika 5.10. i tabela 5.12.). Takođe, na osnovu slike 5.10. može se videti da se sa povećanjem početne koncentracije glukoze smanjuje dužina trajanja fermentacije. Uzimajući u obzir sve napomenute činjenice, predlaže se smanjenje vremena fermentacije na 38 h i izbor početne koncentracija glukoze od 150 g/l kao optimalne vrednosti. U ovom slučaju postižu se sledeće vrednosti najvažnijih parametara alkoholne fermentacije: sadržaj etanola od 8,42% (w/w), prinos etanola od 0,44 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 77,46%, volumetrijska produktivnost od 2,21 g/l·h i potrošnja glukoze od 99,09% (tabela 5.12.), kao i maksimalan broj ćelija od  $2,09 \cdot 10^8$  CFU/ml.

### 5.2.3.2. Uticaj količine inokuluma na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri optimalnoj početnoj koncentraciji glukoze

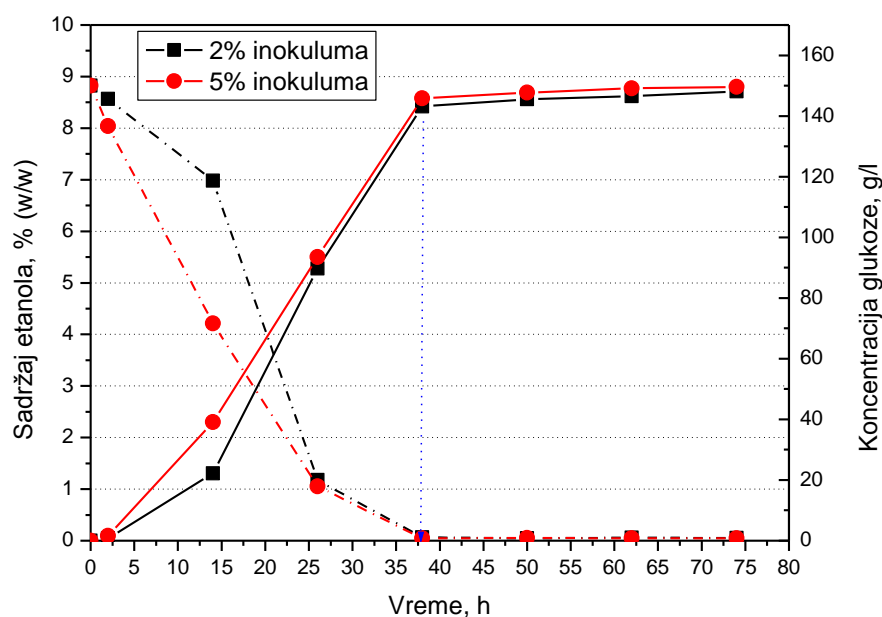
Ovaj set eksperimenata vođen je u cilju ispitivanja uticaja početne količine inokuluma na tok alkoholne fermentacije. Praćena je promena sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija kvasca tokom 74 h fermentacije sa 5% (v/v) inokuluma pri optimalnoj početnoj koncentraciji glukoze od 150 g/l. Rezultati ispitivanja su poređeni sa rezultatima dobijenim tokom fermentacije sa 2% (v/v) inokuluma i prikazani su u tabeli 5.12 i na slikama 5.12. i 5.13.

Tabela 5.12. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih tokom alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa različitom početnom količinom inokuluma.

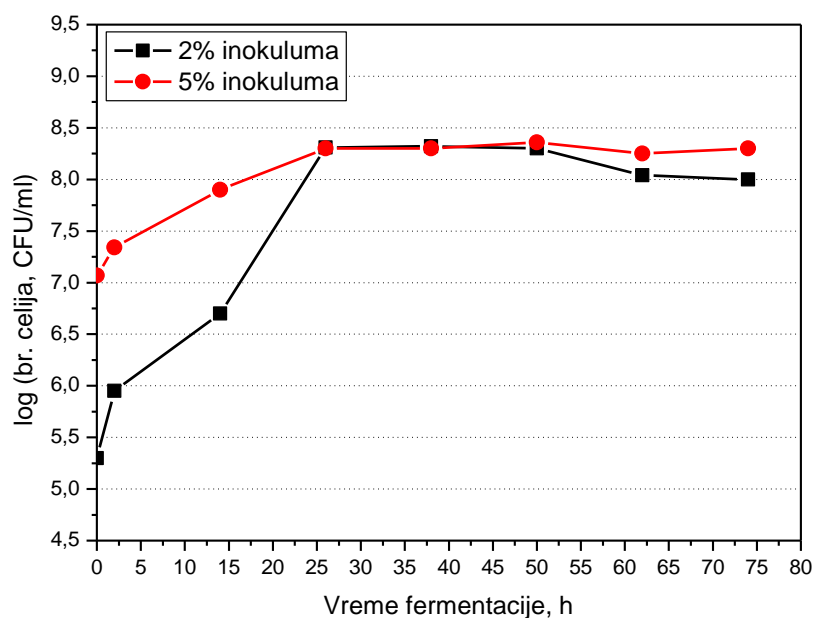
Vreme fermentacije, h	26		38		74	
	2	5	2	5	2	5
Početna konc. inokuluma, % (v/v)	2	5	2	5	2	5
Sadržaj etanola, % (w/w)	5,28	5,50	8,42	8,58	8,71	8,80
Prinos etanola $Y_{P/S}$ , g/g	0,28	0,29	0,44	0,45	0,45	0,46
Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %	48,57	50,60	77,46	78,93	80,13	80,96
Volumetrijska produktivnost P, g/l·h	2,03	2,11	2,21	2,26	1,18	1,19
Konc. glukoze, g/l	20,00	12,80	1,36	1,13	0,90	0,78
Potrošnja glukoze, % <sup>§</sup>	86,67	91,47	99,09	99,25	99,40	99,48

Uslovi procesa: pH=5, t=30 °C, početna konc. glukoze 150 g/l, 2 i 5% (v/v) inokuluma

<sup>§</sup> Potrošnja glukoze je izračunavana prema jednačini (13)



Slika 5.12. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze u toku alkoholne fermentacije sa različitim količinama inokuluma. Početna koncentracija glukoze je 150 g/l. Uslovi procesa hidrolize kao na slici 5.10., a procesa fermentacije kao u tabeli 5.12. Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.



Slika 5.13. Promena broja ćelija kvasca u toku alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa različitim količinama inokuluma. Početna koncentracija glukoze 150 g/l. Uslovi procesa hidrolize kao na slici 5.10., a procesa fermentacije kao u tabeli 5.12.

Iz tabele 5.12. i sa slike 5.12. može se videti da se sa povećanjem količine inokuluma sadržaj etanola značajno ne povećava tokom fermentacije. U toku prvih 26 h potrošnja glukoze je veća pri količini inokuluma od 5% (v/v), a nakon 26 h fermentacije postignut je isti trend opadanja koncentracije glukoze kod obe početne količine inokuluma. Na slici 5.13. može se uočiti da se do 26 h fermentacije sa količinom inokuluma od 2% (v/v) postiže veći porast broja ćelija nego sa količinom inokuluma od 5% (v/v), dok je između 26 i 50 h ta razlika zanemarljiva. Nakon 50 h brže odumiru ćelije kvasca kod fermentacije sa 2% (v/v) inokuluma.

Iz prikazanih rezultata još jednom je potvrđeno da je moguće skratiti vreme trajanja fermentacije na 38 h kada se dobijaju veoma visoke vrednosti svih značajnih parametara fermentacije pri količini inokuluma i od 2 i 5% (v/v). Ukoliko se koristi 5% (v/v) inokuluma nakon 38 h fermentacije postiže se sadržaj etanola od 8,58% (w/w), prinos etanola od 0,45 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 78,93%, volumetrijska produktivnost od 2,26 g/l·h i potrošnja glukoze od 99,25%. Kada se uporede procesni parametri postignuti tokom fermentacije sa 2 i 5% inokuluma (tabela 5.12.), može se videti da nije došlo do značajnog povećanja njihovih vrednosti, pa samim tim nije potrebno povećavati količinu inokuluma. Stoga, količina inokuluma od 2% (v/v) izabrana je kao optimalna vrednost i korišćena je u narednim eksperimentima.

Narendranath i Power [126] u svom radu nisu postigli značajne razlike u sadržaju etanola tokom fermentacije kukuruznog brašna sa *S. cerevisiae* pri različitim količinama inokuluma ( $1 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^7$ ,  $2 \cdot 10^7$ ,  $3 \cdot 10^7$  i  $4 \cdot 10^7$  CFU/ml). Fermentacija je izvođena na 30 °C tokom 72 h, u šaržnom postupku. Sharma i saradnici [70] su izvodili konverziju lignoceluloznih ljuski suncokreta do etanola pomoću *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Oni su zaključili da sa povećanjem količine inokuluma sa 3 na 6% (v/v) dolazi čak do smanjenja prinosa etanola i efikasnosti fermentacije. U njihovom radu maksimalni prinos etanola od 0,453 g/g je ostvaren nakon 24 h fermentacije sa količinom inokuluma od 3% (v/v), što je slično maksimalnom prinosu etanola dobijenom u ovom radu od 0,46 g/g (tabela 5.12.). Međutim, neophodno je naglasiti da su Sharma i saradnici [70] koristili drugačiju sirovinu nego u ovoj disertaciji, odnosno lignoceluloznu sirovinu.



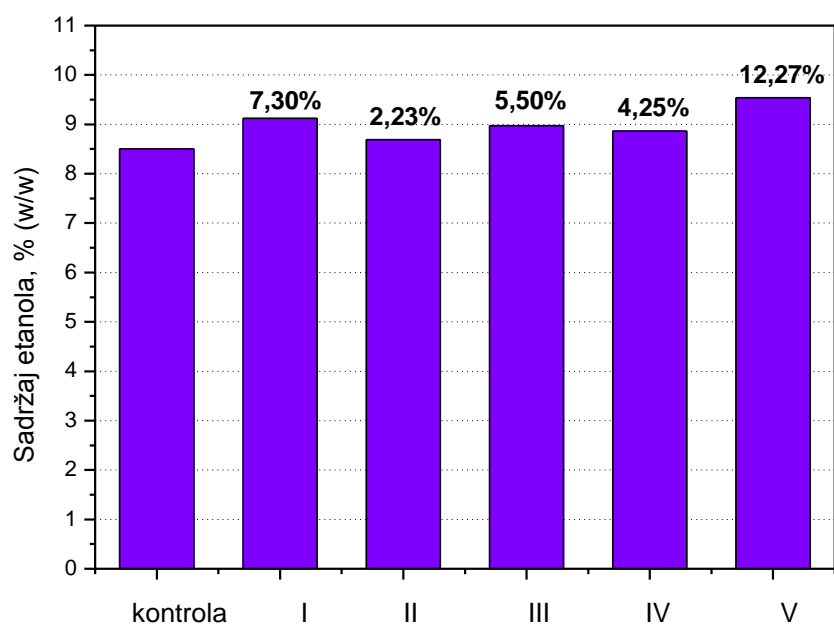
**5.2.3.3. Uticaj dodatka različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina) na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri optimalnim vrednostima početne koncentracije glukoze i količine inokuluma**

Mineralne soli i vitamini su neophodni za odvijanje biohemijskih reakcija u ćeliji, odnosno učestvuju u metabolizmu kvasca kao aktivatori enzima ili ulaze u sastav pojedinih strukturnih delova ćelije. Dodatak mineralnih soli i vitamina pozitivno utiče na rast i viabilnost ćelija kvasca, kao i na povećanje efikasnosti alkoholne fermentacije. Ovaj set eksperimenata vođen je u cilju ispitivanja poboljšanja proizvodnje etanola i rasta kvasca dodatkom različitih aktivatora kvasca (mineralnih soli i vitamina) u hidrolizat kukuruznog brašna. Fermentacija je izvođena pri optimalnim vrednostima početne koncentracije glukoze od 150 g/l i količine inokuluma od 2% (v/v) (početan broj ćelija  $\sim 2 \cdot 10^5$  CFU/ml). Korišćeni su sledeći aktivatori kvasca: inozitol (1 g/l), tiamin (5 mg/l), piridoksin (5 mg/l), Ca-pantotenat (2 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l što odgovara koncentraciji  $\text{Mg}^{2+}$  jona od 10 mM),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l što odgovara koncentraciji  $\text{Zn}^{2+}$  jona od 1 mM), odvojeno ili u smeši. Istovremeno je izvođena fermentacija hidrolizata bez dodatka aktivatora (kontrolni uzorak) pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata. S obzirom da se prilikom svakog izvođenja alkoholne fermentacije obavezno dodaju soli: 0,4 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  i 4 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (poglavlje 4.2.6.), neophodno je naglasiti da je koncentracija jona  $\text{Mg}^{2+}$  pre dodatnog obogaćivanja hidrolizata iznosila 1,5 mM. Ispitivanje obogaćivanja hidrolizata različitim aktivatorima vršeno je prema sledećim kombinacijama vrsta i koncentracija dodatih aktivatora prikazanim u tabeli 5.13.

Tabela 5.13. Kombinacije vrsta i koncentracija dodatih aktivatora kvasca

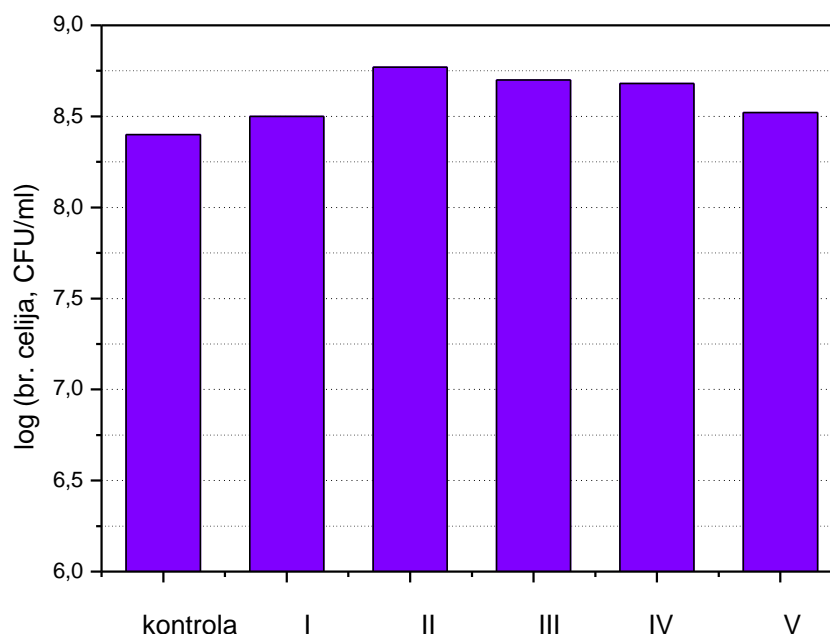
Kombinacija	Vrsta i koncentracija aktivatora
I	inozitol (1 g/l)
II	tiamin (5 mg/l) + piridoksin (5 mg/l)
III	Ca-pantotenat (2 g/l)
IV	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g/l) + $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g/l)
V	Ca-pantotenat (2 g/l) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g/l) + $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g/l)

Sadržaj etanola i broj ćelija kvasca postignuti nakon 48 h alkoholne fermentacije hidrolizata sa dodatkom različitih aktivatora, upoređeni su sa kontrolnim uzorkom (bez aktivatora), i prikazani su na slikama 5.14. i 5.15.



Slika 5.14. Uticaj različitih aktivatora na sadržaj etanola nakon 48 h fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna. Uslovi procesa: parametri dvojno-enzimske hidrolize kao na slici 5.10.; fermentacija -  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ , početna koncentracija glukoze 150 g/l, količina inokuluma 2% (v/v). Vrsta i koncentracija primenjenih aktivatora odgovara kombinacijama prikazanim u tabeli 5.13. Brojevi iznad stubova predstavljaju procenat uvećanja sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak.

Na slici 5.14. se može videti da se maksimalni porast sadržaja etanola od 12,27% u odnosu na kontrolni uzorak postiže pri dodatku sledećih aktivatora: Ca-pantotemat,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (kombinacija V). U ovom slučaju postiže se sadržaj etanola od 9,54% (w/w). Sadržaj etanola u kontrolnom uzorku iznosio je 8,50% (w/w). Značajni porast sadržaja etanola (7,30% u odnosu na kontrolni uzorak) postiže se i pri dodatku inozitola (kombinacija I) kada je dostignut sadržaj etanola od 9,12% (w/w). Najmanji porast sadržaja etanola (2,23% u odnosu na kontrolni uzorak) postiže se korišćenjem tiamina i piridoksina (kombinacija II) kao aktivatora. U tom slučaju sadržaj etanola nakon završene fermentacije iznosio je 8,69% (w/w).



Slika 5.15. Uticaj različitih aktivatora na broj ćelija kvasca nakon 48 h alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna. Uslovi procesa su kao na slici 5.14. Vrsta i koncentracija primenjenih aktivatora odgovara kombinacijama prikazanim u tabeli 5.13.

Ispitivanjem uticaja dodatih aktivatora na rast kvasca (slika 5.15.) može se uočiti da je u uzorcima sa dodatkom inozitola (kombinacija I) i smeše Ca-pantotenata,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  i  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (kombinacija V) došlo do veoma malog porasta broja ćelija kvasca u odnosu na kontrolu, i to za 0,1 i 0,12 logaritamskih jedinica, respektivno. Maksimalni porast broja ćelija kvasca (za 0,37 logaritamskih jedinica u odnosu na kontrolni uzorak) postignut je pri dodatku tiamina i piridoksina (kombinacija II) kao aktivatora. U ovom slučaju, broj ćelija kvasca nakon 48 h fermentacije je iznosio  $5,89 \cdot 10^8$  CFU/ml, dok je u kontrolnom uzorku broj ćelija  $2,51 \cdot 10^8$  CFU/ml.

Prema rezultatima prikazanim na slikama 5.14. i 5.15., dodatak kombinacije mineralnih soli i vitamina (Ca-pantotenat,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  i  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) doprineo je postizanju maksimalnog porasta sadržaja etanola i veoma malom porastu broja ćelija kvasca, jer je potrošnja supstrata usmerena više ka produkciji etanola nego ka stvaranju biomase. Nasuprot tome, dodatkom tiamina i piridoksina kao aktivatora postignut je maksimalni porast broja ćelija i najmanji porast sadržaja etanola. Prema tome, kao najpogodniji aktivatori izabrani su Ca-pantotenat,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  i  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

(kombinacija V), odnosno smeša mineralnih soli i vitamina, s obzirom da je u tom slučaju dostignut najveći porast sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak. Naime, u toku proizvodnje etanola neophodno je da se postigne što viši sadržaj etanola tokom fermentacije kako bi se smanjili troškovi destilacije etanola, a samim tim i ukupni troškovi proizvodnje etanola.

Joni metala koji su prisutni u fermentacionom medijumu imaju značajan uticaj na proizvodnju etanola i fiziologiju ćelija kvasca. Joni magnezijuma direktno utiču na brzinu rasta kvasca, potrošnju šećera i proizvodnju etanola [194]. Uticaj magnezijuma na proizvodnju etanola pomoću *S. cerevisiae* je ispitivan od strane nekoliko autora. Dombek i Ingram [195] su objavili da je dodavanje 0,5 mM magnezijuma produžilo eksponencijalnu fazu rasta kvasca, povećalo stvaranje biomase i smanjilo opadanje brzine alkoholne fermentacije. Birch i Walker [120] su u svom radu pokazali da visoke koncentracije magnezijuma u medijumu (iznad 50 mM) doprinose poboljšanju preživljavanja ćelija kvasca u uslovima visokih koncentracija etanola, odnosno generalno imaju zaštitnu ulogu kod ćelija kvasca izloženih stresu. Cink je takođe veoma važan metal za fermentativni metabolizam kvasca. Ovaj metal utiče na povećanje brzine fermentacije, s obzirom da je neophodan za aktivnost enzima alkoholdehidrogenaze i stimuliše potrošnju maltoze i maltotrioze u ćelijama kvasca [196]. Fermentacija se značajno usporava padom koncentracije cinka ispod 0,1 mg/l [112].

Alfenore i saradnici [115] su izvodili alkoholnu fermentaciju dolivnim postupkom, na sintetičkom medijumu pomoću kvasca *S. cerevisiae*. Koristeći različite količine vitamina (biotin, pantotensku kiselinu, nikotinsku kiselinu, inozitol, tiamin, piridoksin, para-aminobenzojevu kiselinu) i eksponencijalnu strategiju dodavanja aktivatora postigli su značajno povećanje prinosa etanola. Kao i kod rezultata prikazanih na slikama 5.14. i 5.15., i u njihovom radu je zapažen isti odnos između rasta kvasca i proizvodnje etanola, odnosno sposobnost ćelija kvasca kod kojih nije zapažen značajan rast da održe povećanu proizvodnju etanola (ovaj fenomen je zapažen pri visokim koncentracijama etanola). Kotarska i saradnici [116] su ispitivali uticaj dodatka različitih aktivatora na alkoholnu fermentaciju pirinčane kaše. Dodatkom  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l), biotina (0,001 g/l) i biotina sa tiaminom (0,1 g/l) nije postignuto značajno poboljšanje alkoholne fermentacije. Najbolje rezultate postigli su primenom sledećih aktivatora: mineralnih soli  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/l, sojinog brašna (2 g/l) i sojinog ulja (3,4 ml/l).

Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h alkoholne fermentacije hidrolizata sa dodatkom Ca-pantotenata,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (kombinacija V) kao najpogodnijih aktivatora, upoređeni su sa kontrolnim uzorkom i prikazani su u tabeli 5.14.

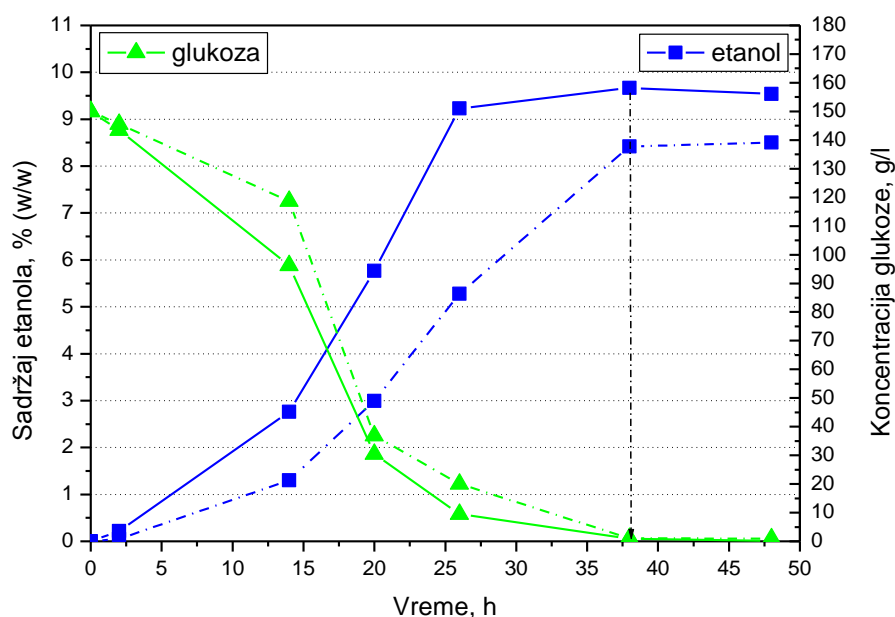
Tabela 5.14. Uticaj dodatka mineralnih soli i vitamina na vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna

<b>Parametar</b>	<b>Kontrola (bez aktivatora)</b>	<b>Ca-pantotenat (2 g/l) + <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> (2 g/l) + <math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> (0,3 g/l)</b>
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	8,50	9,54
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,44	0,50
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	78,20	87,76
<b>Vol. produktivnost P, g/l·h</b>	1,77	1,99
<b>Koncentracija glukoze, g/l</b>	1,20	0,10
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	99,20	99,93

Uslovi procesa su kao na slici 5.14. Vrsta i koncentracija primenjenih aktivatora odgovara kombinaciji V prikazanoj u tabeli 5.13.

U tabeli 5.14. može se uočiti da je dodatak Ca-pantotenata,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pored porasta sadržaja etanola, doprineo i značajnom porastu vrednosti ostalih procesnih parametara u odnosu na kontrolni uzorak.

Nakon utvrđivanja da je smeša Ca-pantotenata,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  najpogodnija kombinacija primenjenih aktivatora, praćena je kinetika alkoholne fermentacije hidrolizata obogaćenog sa dodatkom istih. Sadržaj etanola i koncentracija glukoze određivani su nakon 2, 14, 20, 26, 38 i 48 h fermentacije, a broj ćelija kvasca je određivan nakon 20 i 48 h fermentacije. Proizvodnja etanola i potrošnja glukoze tokom 48 h alkoholne fermentacije hidrolizata sa i bez dodatka aktivatora (kombinacije aktivatora V) prikazani su na slici 5.16. Broj ćelija kvasca nakon 20 i 48 h fermentacije sa i bez dodatka aktivatora (kombinacije aktivatora V) prikazan je u tabeli 5.15.



Slika 5.16. Kinetika proizvodnje etanola i potrošnje glukoze tokom alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa i bez dodatka aktivatora. Uslovi procesa i korišćeni aktivatori su kao u tabeli 5.14. Puna linija - sa dodatkom aktivatora, isprekidna linija – kontrola (bez dodatka aktivatora)

Tabela 5.15. Promena broja ćelija kvasca tokom alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa i bez dodatka aktivatora

Vreme fermentacije, h	Broj ćelija, CFU·10 <sup>6</sup> /ml		log (br. ćelija, CFU/ml)	
	Kontrola	Uzorak	Kontrola	Uzorak
0	0,2	0,2	5,3	5,3
20	79,4	85,1	7,90	7,93
48	251	331	8,40	8,52

Uslovi procesa i korišćeni aktivatori su kao u tabeli 5.14.

Poređenjem kinetike proizvodnje etanola tokom fermentacije hidrolizata obogaćenog aktivatorima i kontrolnog uzorka (slika 5.16.) može se videti da je dodatak smeše vitamina i mineralnih soli značajno doprineo povećanju proizvodnje etanola, i to već nakon 4 h fermentacije. U uzorku sa dodatim aktivatorima može se uočiti nagli porast

sadržaja etanola u periodu između 14 i 26 h fermentacije, a u skladu sa tim došlo je i do naglog pada koncentracije glukoze u istom periodu. U 26 h fermentacije postiže veoma visoka vrednost sadržaja etanola od 9,23% (w/w), a zatim blagi porast u 38 h fermentacije kada se dostiže maksimalni sadržaj etanola od 9,67% (w/w). Nakon toga se dolazi do pada sadržaja etanola (krajnji sadržaj etanola iznosi 9,54% w/w) usled neznatne inhibicije kvasca proizvodom. U kontrolnom uzorku se nije javila inhibicija proizvodom. Na slici 5.16. se takođe može videti da je glukoza skoro potpuno iskorišćena već nakon 38 h fermentacije kada se i dostiže maksimalni sadržaj etanola.

Kao što je ranije prikazano (poglavlje 5.2.3.1.), u kontrolnom uzorku uspešno se može skratiti vreme fermentacije na 38 h (kada je dostignut sadržaj etanola od 8,42% w/w). Takođe, i u slučaju obogaćivanja hidrolizata smešom mineralnih soli i vitamina ekonomika fermentacije hidrolizata se može poboljšati skraćanjem vremena fermentacije na 38 h kada se postižu vrlo visoke vrednosti svih procesnih parametara: sadržaj etanola od 9,67% (w/w), prinos etanola od 0,50 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 88,96%, volumetrijska produktivnost od 2,54 g/l·h i potrošnja glukoze od 93,69%.

U tabeli 5.15. se može videti da se dodatkom ove kombinacije aktivatora ne postiže značajna razlika u broju ćelija u poređenju sa kontrolnim uzorkom (kao što se može videti i na slici 5.15.) i u 20 i 48 h fermentacije.

Iako se dodatkom mineralnih soli i vitamina postižu značajna poboljšanja proizvodnje etanola, značajan faktor upotrebe ovih aktivatora je i njihova visoka cena. Zbog toga se često u industrijskoj praksi pribegava jeftinijim rešenjima, kao što je upotreba nus proizvoda raznih tehnologija. U tu svrhu može se koristiti npr. CSL (corn steep liquor), voda zaostala nakon močenja kukuruza, koji se zbog svoje dostupnosti i niske cene može uspešno koristiti u našoj zemlji, kao što su svom radu prikazali Bebić i saradnici [184]. Kao aktivatori takođe se mogu koristiti i sojino brašno, sojino ulje, autolizat kvasca, ekstrakt kvasca i sl. [116].

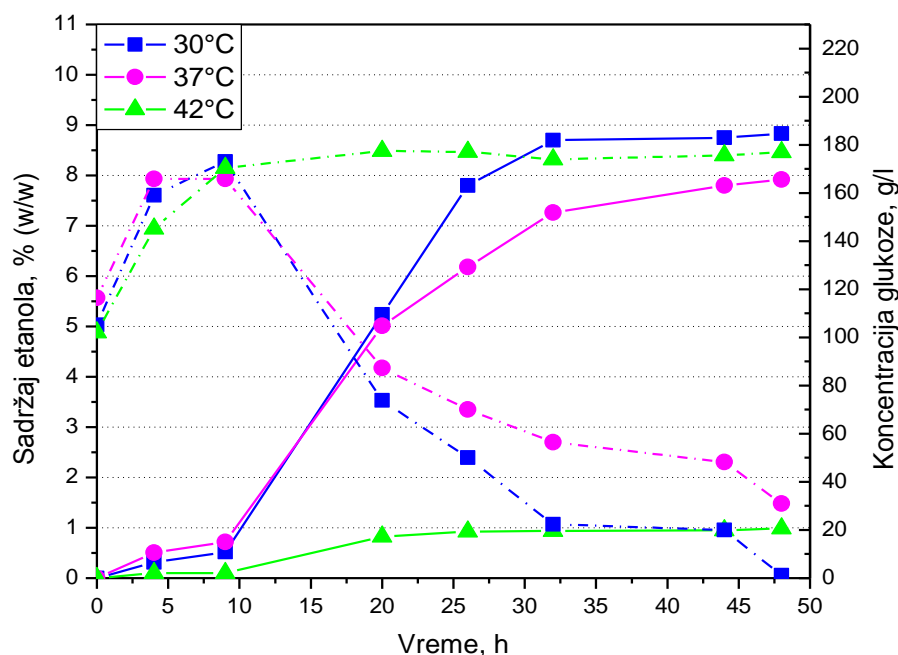
#### **5.2.3.4. *Proizvodnja etanola u postupku simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kukuruznog brašna***

U ovim eksperimentima je ispitana mogućnost poboljšanja produktivnosti proizvodnje etanola koristeći postupak simultane saharifikacije i fermentacije (SSF proces). Primenom ovog procesa smanjuju se ukupni troškovi procesa, postiže se veća efikasnost proizvodnje i veći prinos etanola [159]. U narednim eksperimentima ispitivana je optimalna temperatura izvođenja SSF procesa i njen uticaj na rast kvasca i proizvodnju etanola. Takođe je i ispitivano dodavanje vitamina i mineralnih soli kao aktivatora kvasca radi povećanja prinosa etanola u SSF procesu.

##### *5.2.3.4.1. Uticaj temperature na tok SSF procesa*

Temperatura rasta i razmnožavanja kvasaca iz roda *Saccharomyces* koji se koriste u proizvodnji etanola je u opsegu 30-35 °C, što se razlikuje od temperature na kojoj se izvodi faza saharifikacije pomoću glukoamilaza (55-60 °C). Združivanjem faze saharifikacije i fermentacije potrebno je obezbediti uslove koji bi bili optimalni i za enzim i za kvasac. Ovaj set eksperimenata vođen je u cilju određivanja optimalne temperature za izvođenje SSF procesa. U tu svrhu ispitivane su tri radne temperature: 30, 37 i 42 °C. Sadržaj etanola, koncentracija glukoze i broj ćelija mereni su nakon 4, 8, 20, 26, 32, 44 i 48 h SSF procesa. Korišćene su optimalne koncentracije enzima Termamyl SC (0,02% v/w) i SAN Extra L (0,12% v/w), kao i optimalna količina inokuluma od 2% (v/v), određeni u prethodnim eksperimentima. Koncentracija glukoze na početku SSF procesa (nakon likvefakcije) iznosila je ~100 g/l. Početan broj ćelija kvasca je iznosio  $\sim 2 \cdot 10^5$  CFU/ml. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze u toku 48 h SSF procesa prikazana je na slici 5.17.





Slika 5.17. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze tokom SSF procesa kukuruznog brašna pri različitim temperaturama. Uslovi procesa: likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w), brz. mešanja  $v=150\text{ rpm}$ ; SSF proces -  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=48\text{ h}$ , brz. mešanja  $v=100\text{ rpm}$ ,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w), količina inokuluma 2% (v/v). Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.

Na slici 5.17. se može videti da se maksimalni sadržaj etanola od 8,83% (w/w) postiže na temperaturi od 30 °C nakon 48 h SSF procesa. Trend porasta sadržaja etanola je bio sličan do 20 h SSF procesa na temperaturama 30 i 37 °C. Međutim, nakon 20 h znatno više vrednosti sadržaja etanola u SSF procesu su dostignute na 30 °C. Na temperaturi od 37 °C maksimalni sadržaj etanola je iznosio 7,92% (w/w) posle 48 h. Takođe je i ispitivano izvođenje SSF procesa na 42 °C, s obzirom da je optimalna temperatura dejstva glukoamilaze u opsegu 55-60 °C. Međutim, kao što je prikazano na slici 5.17., na ovoj temperaturi postignute su veoma niske vrednosti sadržaja etanola (0,098-0,99% w/w). Prema tome, za izvođenje SSF procesa poželjne su niže temperature kako bi se povećala metabolička aktivnost kvasca što rezultuje u efikasnijoj fermentaciji.

Sree i saradnici [197] su predložili upotrebu termotolerantnih kvasaca kako bi se uspešno izvodila fermentacija i na 42 °C sa povećanim prinosom etanola. Kádár i saradnici [198] su ispitivali SSF proces sa *S. cerevisiae*, ali na različitim lignoceluloznim

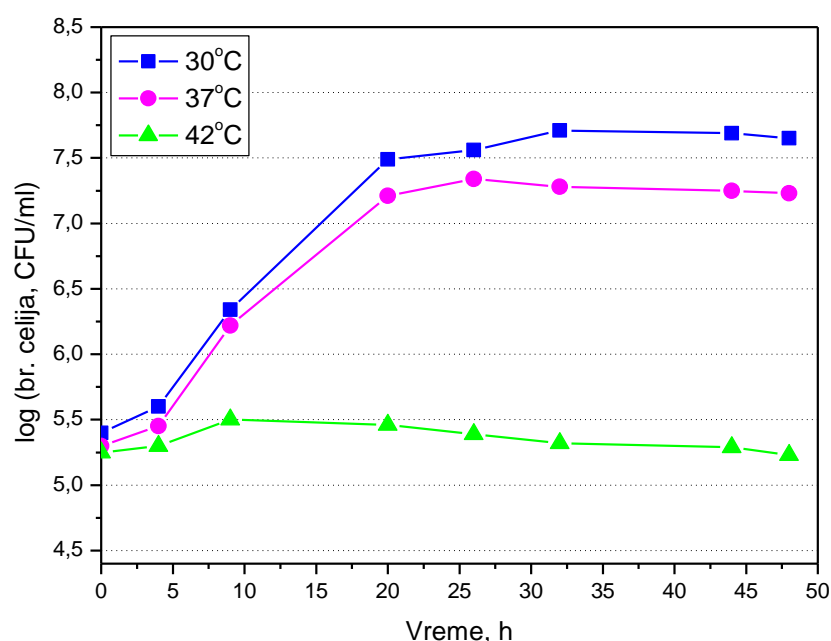
materijalima (papir, karton i čisti celulozni prašak). Prema dobijenim vrednostima sadržaja etanola, prinosa etanola i konverzije celuloze nakon 72 h, oni su utvrdili da se *S. cerevisiae* može koristiti čak i na 40 °C u SSF procesu. Nasuprot tome, Phisalaphong i saradnici [199] su u svom radu prikazali da koncentracija i prinos etanola opadaju sa porastom temperature. Oni su koristili melasu šećerne trske kao izvor ugljenika za *S. cerevisiae* i izvodili eksperimente u šaržnom postupku na temperaturama od 30 do 42 °C. Zaključili su da koncentracija etanola neznatno raste sa porastom temperature od 30 do 33 °C, ali veoma brzo opada na temperaturama iznad 35 °C, što je slično sa rezultatima prikazanim na slici 5.17. McMeekin i saradnici [200] su objavili da su negativni efekti visokih temperatura upravo denaturacija ribozoma i enzima, kao i problemi vezani za fluidnost ćelijske membrane. Negativni uticaji visokih temperatura su takođe ispitivani u radu Banat-a i saradnika [109]. Oni su pokazali da visoke temperature izazivaju povećanje fluidnosti membrane i da kvasci odgovaraju na ovu fizičku promenu tako što se menja sastav masnih kiselina. Takođe su utvrdili da toplota i visoke koncentracije etanola mogu izazvati promene u membrani, denaturaciju proteina, inhibiciju glukoze i pojavu mutacija kod kvasca.

Kao što je prikazano na slici 5.17., vrednosti koncentracije glukoze su bile najviše na temperaturi od 42 °C a najniže na 30 °C. Ovi rezultati su u skladu sa prikazanom promenom sadržaja etanola tokom SSF procesa s obzirom da kvasci koriste glukožu kao izvor ugljenika u proizvodnji etanola. Takođe je zapaženo povećanje koncentracija glukoze na početku SSF procesa (u prvih 8 h) na 30 i 37 °C, ukazujući na to da je brzina hidrolize skroba bila veća od brzine potrošnje glukoze od strane ćelija kvasca. U skladu sa ovim, nije uočena ni značajna proizvodnja etanola na početku SSF procesa. Nakon 8 h procesa na 30 i 37 °C, vrednosti koncentracije glukoze su opadale i dostigle krajnje vrednosti od 1,22 i 30,32 g/l, respektivno. Na temperaturi od 30 °C glukoza je skoro potpuno utrošena što ukazuje na kraj fermentacije. Međutim, za izvođenje SSF procesa na višoj temperaturi od 37 °C potrebno je duže vreme kako bi se utrošio sav dostupan šećer. Tokom izvođenja procesa na 42 °C koncentracija glukoze je rasla tokom SSF procesa, bez pojave potrošnje glukoze s obzirom da je visoka temperatura negativno uticala na kvasac. U ovom slučaju, nakon 8 h koncentracija glukoze je bila skoro konstantna (~177 g/l).

U radu Montesinos-a i Navarro-a [186] takođe je uočen porast koncentracije glukoze na početku SSF procesa pšeničnog brašna sa *S. cerevisiae* na 35 °C. Ovaj fenomen

je zapažen i u radu Zhu i saradnika [62] tokom prvih 12 h SSF procesa pirinčane slame koja je izložena predtretmanu mikrotalasima i alkalijama. Proces je izvođen sa *S. cerevisiae*, ali na prilično visokoj temperaturi od 40 °C. Öhgren i saradnici [64] su postigli povećanje koncentracije glukoze tokom prvih 10 h SSF procesa kukuruza na 30 °C pomoću *S. cerevisiae*. Ovu pojavu su objasnili kao rezultat velikog viskoziteta i neefikasnog mešanja.

Promena broja ćelija kvasca tokom SSF procesa kukuruznog brašna pri različitim temperaturama prikazana je na slici 5.18.



Slika 5.18. Promena broja ćelija kvasca u toku SSF procesa kukuruznog brašna pri različitim temperaturama. Uslovi procesa su isti kao na slici 5.17.

Na slici 5.18. se može videti da je maksimalan broj ćelija od  $5,13 \cdot 10^7$  CFU/ml, kao i visok sadržaj etanola, postignut na temperaturi od 30 °C nakon 32 h SSF procesa (slike 5.17. i 5.18.), kada je ostvaren porast broja ćelija za 2,31 logaritamsku jedinicu u odnosu na početan broj. Na radnim temperaturama od 30 i 37 °C nije uočena faza odumiranja ćelija kvasca, zbog toga što je simultanom saharifikacijom i fermentacijom obezbeđeno dovoljno šećera za ishranu ćelija kvasca tokom 48 h. Poredeći ove rezultate sa rezultatima na slici 5.11., može se videti da je faza odumiranja ćelija kod procesa odvojene saharifikacije i fermentacije (SHF) počela ranije, nakon 38 h procesa (na 30 °C). Na slici

5.18. takođe se može videti da je na temperaturi od 42 °C postignut veoma mali broj ćelija kvasca, što ukazuje na inhibitorno dejstvo visoke temperature i visoke koncentracije glukoze na ćelijski rast. U ovom slučaju zapažena je veoma kratka eksponencijalna faza, a odumiranje ćelija je otpočelo već nakon 8 h SSF procesa.

Phisalaphong i saradnici [199] tvrde da visoke temperature utiču na promenu aktivnog transporta rastvornih jedinjenja i rastvarača u ćeliji kvasca, i na taj način uzrokuju akumulaciju toksičnih materija unutar ćelije uključujući i etanol. Oni su objavili da rast ćelija kvasca značajno opada na temperaturama iznad 35 °C. Smanjenje viabilnosti ćelija kvasca, ispitivano u radu Torija i saradnika [201], takođe se smatra da je uzrokovano povećanom akumulacijom intracelularnog etanola na visokim temperaturama. Lucero i saradnici [202] su objavili da toksične koncentracije intracelularnog etanola utiču na strukturu ćelijske membrane uzrokujući opadanje njene funkcionalnosti.

Kako bi se izvršila procena optimalne dužine trajanja SSF procesa izračunate su vrednosti procesnih parametara dobijenih nakon 32 i 48 h SSF procesa na temperaturama od 30 i 37 °C, i prikazane su u tabeli 5.16. Veoma niske vrednosti ovih procesnih parametara dobijene tokom SSF procesa na temperaturi od 42 °C nisu prikazane u tabeli 5.16. s obzirom da se smatraju zanemarljivim.

U tabeli 5.16. se može videti da su znatno više vrednosti procesnih parametara postignute u SSF procesu na 30 °C, nego na 37 °C. Vrednosti sadržaja etanola i procenta od teorijskog sadržaja etanola nakon 32 i 48 h SSF procesa na 30 °C su bile veoma bliske, a prinosi etanola skoro isti (0,45 i 0,46, respektivno). Međutim, vrednost volumetrijske produktivnosti na 30 °C nakon 32 h procesa (2,72 g/l·h) je bila znatno viša nego nakon 48 h (1,84 g/l·h). Kao što je prikazano na slici 5.17., dužina trajanja SSF procesa opada na nižim temperaturama. Na osnovu svega navedenog, uspešno se može skratiti vreme trajanja SSF procesa na 32 h, što bi značajno umanjilo ukupne troškove proizvodnje etanola. Takođe, na osnovu rezultata prikazanih na slikama 5.17. i 5.18. i u tabeli 5.16. izabrana je optimalna temperatura SSF procesa od 30 °C. U ovom slučaju, postignute su sledeće vrednosti procesnih parametara: sadržaj etanola od 8,70% (w/w), procenat od teorijskog sadržaja etanola od 80,04%, prinos etanola od 0,45 g/g, volumetrijska produktivnost od 2,72 g/l·h i potrošnja glukoze od 78,75% (tabela 5.16.). Potrebno je naglasiti, da izvođenjem SSF procesa na optimalnoj temperaturi od 30 °C postižu se značajne uštede energije u poređenju sa procesom odvojene saharifikacije i fermentacije (SHF). Naime, temperatura

od 30 °C je znatno niža od optimalne temperature za dejstvo glukoamilaze (55 °C) u fazi saharifikacije, a pritom se postižu zadovoljavajuće vrednosti svih procesnih parametara. Takođe, združivanjem faza saharifikacije i fermentacije skraćuje se ukupno vreme procesa za 4 h, koliko iznosi vreme potrebno za izvođenje saharifikacije.

Tabela 5.16. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih tokom SSF procesa kukuruznog brašna

<b>Temperatura, °C</b>	<b>30</b>		<b>37</b>	
<b>Vreme SSF procesa, h</b>	32	48	32	48
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	8,70	8,83	7,26	7,92
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	80,04	81,23	66,79	72,86
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,45	0,46	0,38	0,41
<b>Vol. produktivnost P, g/l·h</b>	2,72	1,84	2,27	1,65
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	78,75	98,84	51,54	73,46

Uslovi procesa su isti kao na slici 5.17.

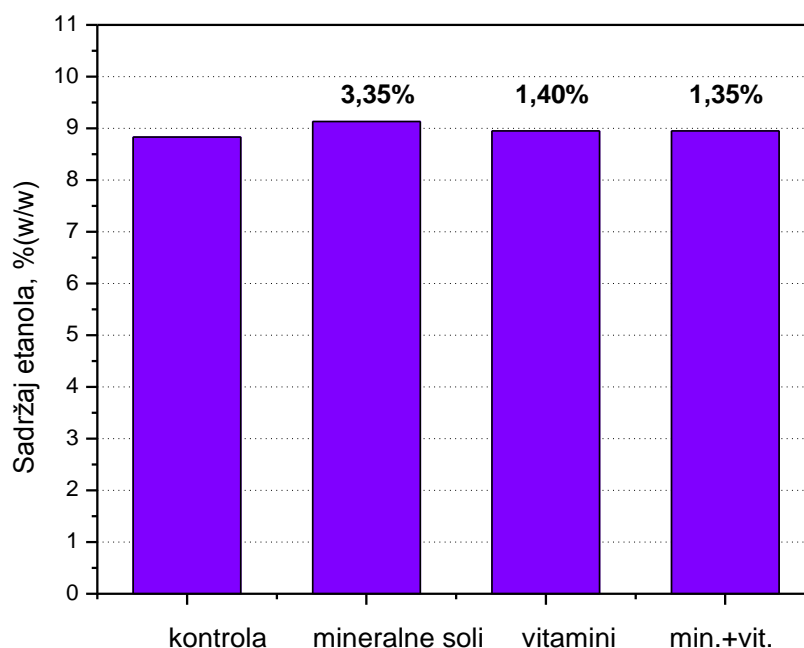
Phisalaphong i saradnici [199] ispitivali su uticaj različitih temperatura na tok SSF procesa melase šećerne trske, i postigli su prinose etanola od 0,22 do 0,51 u zavisnosti od temperature i početne koncentracije šećera. Maksimalan sadržaj etanola u njihovoj studiji ostvaren je posle 35 h na 30 °C, dok je najniža vrednost prinosa etanola dobijena na temperaturi od 42 °C, što je slično rezultatima prikazanim na slici 5.17. i u tabeli 5.15. Zhu i saradnici [62] su ispitivali SSF proces pirinčane slame (tretirane mikrotalasima i alkalijama) tokom 72 h koristeći kvasac *S. cerevisiae*. Oni su postigli koncentraciju etanola od 25,8 g/l i prinos etanola od 0,575 pri optimalnoj temperaturi od 40 °C, što je znatno viša temperatura od optimalne temperature izabrane u ovom radu. Suprotno od pomenutih autora, Montesinos and Navaro [186] su koristili skrobnu sirovinu (pšenično brašno) u SSF procesu pomoću *S. cerevisiae*. Pri optimalnim vrednostima parametara: koncentracija enzima od 270 AGU/kg skroba, vreme trajanja SSF procesa od 36 h i temperatura od 35 °C, dobijena je koncentracija etanola od 69 g/l i sličan prinos etanola kao u ovom radu od 0,46 g/g. Vrednost optimalne temperature (35 °C) u njihovoj studiji bila je nešto viša nego

u ovom radu, verovatno jer su koristili vrste kvasca koje su tolerantnije na visoke temperature.

#### 5.2.3.4.2. Uticaj dodatka različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina) na tok SSF procesa

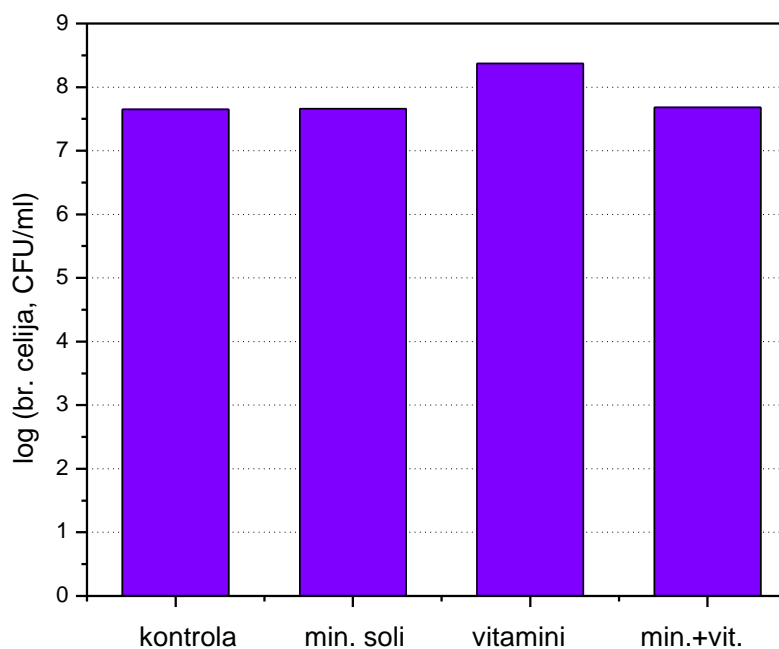
Ovaj set eksperimenata je vođen u cilju ispitivanja poboljšanja proizvodnje etanola i rasta kvasca tokom SSF procesa dodatkom različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina). Korišćene su optimalne koncentracije enzima Termamyl SC (0,02% v/w) i SAN Extra L (0,12% v/w), optimalna količina inokuluma od 2% (v/v) i optimalna temperatura procesa od 30 °C, određeni u prethodnim eksperimentima. Koncentracija glukoze na početku SSF procesa (nakon likvefakcije) iznosila je ~100 g/l. Početan broj ćelija kvasca je iznosio  $\sim 2 \cdot 10^5$  CFU/ml. Dodavani su sledeći aktivatori kvasca:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l što odgovara koncentraciji  $\text{Mg}^{2+}$  jona od 10 mM),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l što odgovara koncentraciji  $\text{Zn}^{2+}$  jona od 1 mM), Ca-pantotenat (30 mg/l), inozitol (350 mg/l) i biotin (64  $\mu\text{g/l}$ ), i to na sledeći način – samo mineralne soli, samo vitamini i smeša mineralnih soli i vitamina. Tiamin i piridoksin nisu korišćeni s obzirom da njihovim dodatkom u hidrolizat nije postignut značajni porast sadržaja etanola u prethodnom eksperimentu (slika 5.14.). Istovremeno je izvođen SSF proces bez dodatka aktivatora (kontrolni uzorak) pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata. S obzirom da se prilikom svakog izvođenja alkoholne fermentacije obavezno dodaju soli: 0,4 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  i 4 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (poglavlje 4.2.6.), neophodno je naglasiti da je koncentracija jona  $\text{Mg}^{2+}$  pre dodatnog obogaćivanja hidrolizata iznosila 1,5 mM.

Sadržaj etanola i broj ćelija kvasca postignuti nakon 48 h SSF procesa sa dodatkom samo mineralnih soli, samo vitamina i smeše mineralnih soli i vitamina, upoređeni su sa kontrolnim uzorkom (bez aktivatora), i prikazani su na slikama 5.19. i 5.20.



Slika 5.19. Uticaj dodatka mineralnih soli, vitamina i smeše mineralnih soli i vitamina na sadržaj etanola nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.17. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3 g/l),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2 g/l), Ca-pantotenat (30 mg/l), biotin (64  $\mu$ g/l), inozitol (350 mg/l). Brojevi iznad stubova predstavljaju procenat uvećanja sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak.

Na slici 5.19. se može videti da se maksimalni porast sadržaja etanola (3,35% u odnosu na kontrolni uzorak) nakon 48 h SSF procesa postiže pri dodatku samo mineralnih soli. U ovom slučaju postiže se sadržaj etanola od 9,13% (w/w). Sadržaj etanola u kontrolnom uzorku iznosio je 8,83% (w/w). Veoma mali porast sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak postignut je pri dodatku samo vitamina i smeše vitamina i mineralnih soli i iznosio je 1,40 i 1,35%, respektivno.



Slika 5.20. Uticaj dodatka mineralnih soli, vitamina i smeše mineralnih soli i vitamina na broj ćelija kvasca nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.17. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori su isti kao na slici 5.19.

Na slici 5.20. se može videti da je na rast kvasca najviše uticao dodatak vitamina, s obzirom da je u tom slučaju broj ćelija povećan u odnosu na kontrolni uzorak za 0,72 logaritamske jedinice nakon 48 h SSF procesa. U ovom slučaju, broj ćelija kvasca iznosio je  $2,34 \cdot 10^8$  CFU/ml. Dodatak mineralnih soli i smeše mineralnih soli i vitamina promenio broj ćelija kvasca veoma malo, za 0,01 i 0,03 logaritamske jedinice u odnosu na kontrolni uzorak, respektivno, što se smatra zanemarljivim.

Prema rezultatima prikazanim na slikama 5.19. i 5.20., dodatak samo mineralnih soli doprineo je postizanju maksimalnog porasta sadržaja etanola i veoma malom porastu broja ćelija kvasca u odnosu na kontrolni uzorak. Ovaj fenomen, da određeni aktivatori usmeravaju metabolizam kvasca ka većoj proizvodnji etanola, a ne ka stvaranju biomase zapažen je i kod procesa odvojene saharifikacije i fermentacije (slike 5.14. i 5.15.). Nasuprot tome, maksimalni porast broja ćelija i veoma mali porast sadržaja etanola postignut je dodatkom samo vitamina kao aktivatora. Prema tome, predlaže se upotreba samo mineralnih soli kao aktivatora kvasca u SSF procesu, s obzirom da je u tom slučaju



dostignut najveći porast sadržaja etanola u odnosu na kontrolu. Takođe, sa aspekta smanjenja troškova proizvodnje, ekonomičnije je koristiti samo mineralne soli u poređenju sa smešom mineralnih soli i vitamina kao aktivatora.

Jedan od problema sa kojim se suočavaju proizvođači etanola u praksi je kako obezbediti dovoljno nutrijenata za kvasac da bi se efikasno izvršila alkoholna fermentacija a pritom smanjio rast kvasca, s obzirom da veća biomasa kvasca podrazumeva gubitak etanola. S druge strane, ćelije kvasca koje rastu proizvode alkohol 33 puta brže nego ćelije kod kojih nije zapažen rast. Prema tome, u industrijskoj praksi značajni napori su ulagani kako bi se održali uslovi koji ne vode ka vrlo malom rastu kvasca ili ka njegovom odumiranju. Rešenja koja nude Walker i saradnici [203] kako bi se umanjio rast kvasca a pritom obezbedila efikasna fermentacija su: visoke početne količine inokuluma, recirkulacija kvasca, izvođenje fermentacije kontinualnim postupkom ili korišćenje imobilisanih ćelija kvasca.

Alfenore i saradnici [115] su u dolivnom postupku fermentacije sa *S. cerevisiae* i koristeći strategiju eksponencijalnog dodavanja različitih količina smeše vitamina (biotin, pantotenska kiselina, nikotinska kiselina, inozitol itd) postigli povećanje produktivnosti etanola za 18% i povećanje maksimalne specifične brzine fermentacije za 34%. Bohlscheid i saradnici [204] su u svom radu objavili da je dodatak biotina veoma uticao na rast kvasca *S. cerevisiae* tokom alkoholne fermentacije soka grožđa. Oni smatraju da minimalna koncentracija biotina neophodna za izvođenje fermentacije iznosi 1 µg/l. Chi i saradnici [205] su objavili da je dodatak inozitola (100 mg/l) uticao na brži rast kvasca i povećanje njegove tolerantnosti na inhibitorno dejstvo visokih koncentracija etanola u medijumu.

Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h SSF procesa sa dodatkom mineralnih soli ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  i  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) kao najpogodnijih aktivatora, upoređeni su sa kontrolnim uzorkom i prikazani u tabeli 5.17.

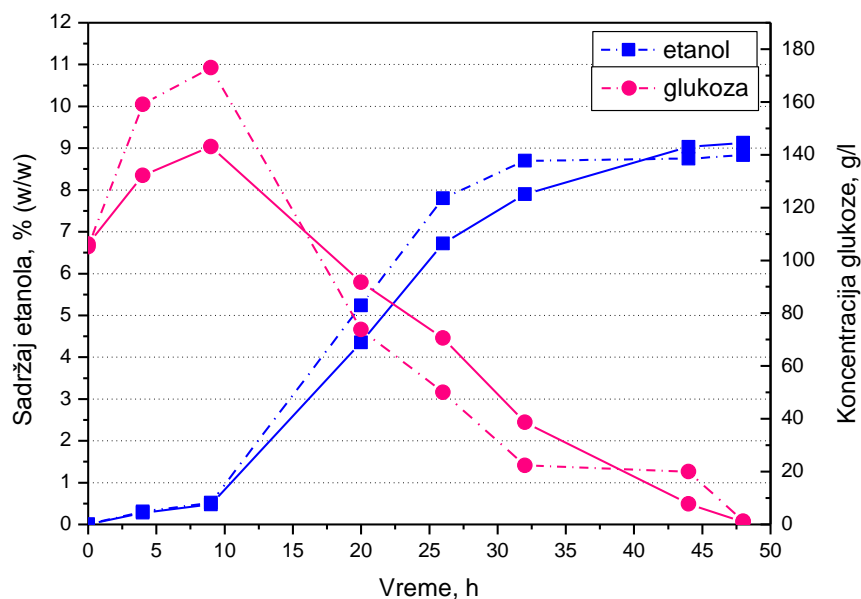
Tabela 5.17. Uticaj dodatka mineralnih soli na vrednosti značajnih procesnih parametara nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna

<b>Parametar</b>	<b>Kontrola (bez aktivatora)</b>	<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2 g/l) + ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,3 g/l)</b>
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	8,83	9,13
<b>Prinos etanola Y<sub>P/S</sub>, g/g</b>	0,46	0,48
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	81,23	83,99
<b>Vol. produktivnost P, g/l·h</b>	1,84	1,90
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	98,84	99,19

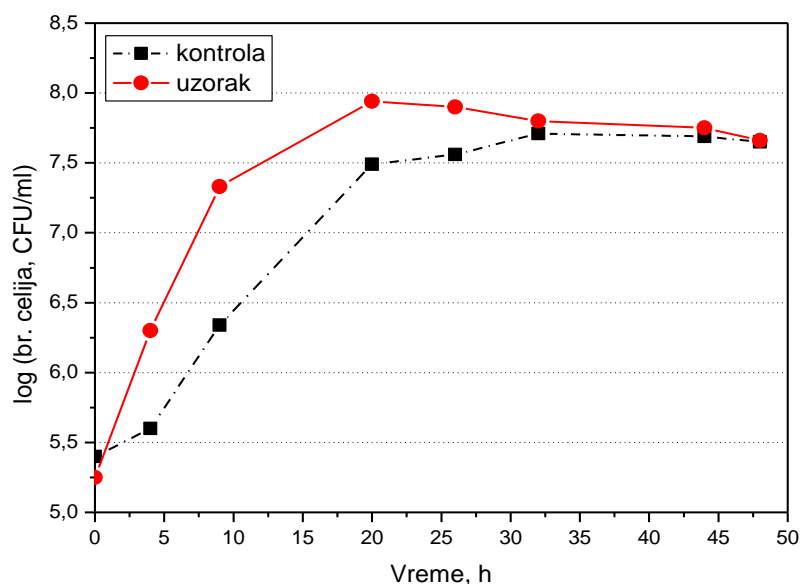
Uslovi procesa su kao na slici 5.19.

U tabeli 5.17. može se uočiti da je dodatak mineralnih soli (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) pored povećanja sadržaja etanola, doprineo i povećanju vrednosti ostalih procesnih parametara.

Nakon utvrđivanja da su mineralne soli (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) najpogodniji aktivatori, praćena je kinetika SSF procesa sa dodatkom istih. Sadržaj etanola, koncentracija glukoze i broj ćelija kvasca određivani su nakon 4, 8, 20, 26, 32, 44 i 48 h SSF procesa. Proizvodnja etanola, potrošnja glukoze i promena broja ćelija kvasca u toku 48 h SSF procesa sa i bez dodatka aktivatora prikazani su na slikama 5.21. i 5.22.



Slika 5.21. Kinetika proizvodnje etanola i potrošnje glukoze tokom SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez dodatka mineralnih soli. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.17. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3 g/l) i  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2 g/l). Puna linija- sa dodatkom aktivatora, isprekidna linija – kontrola (bez dodatka aktivatora).



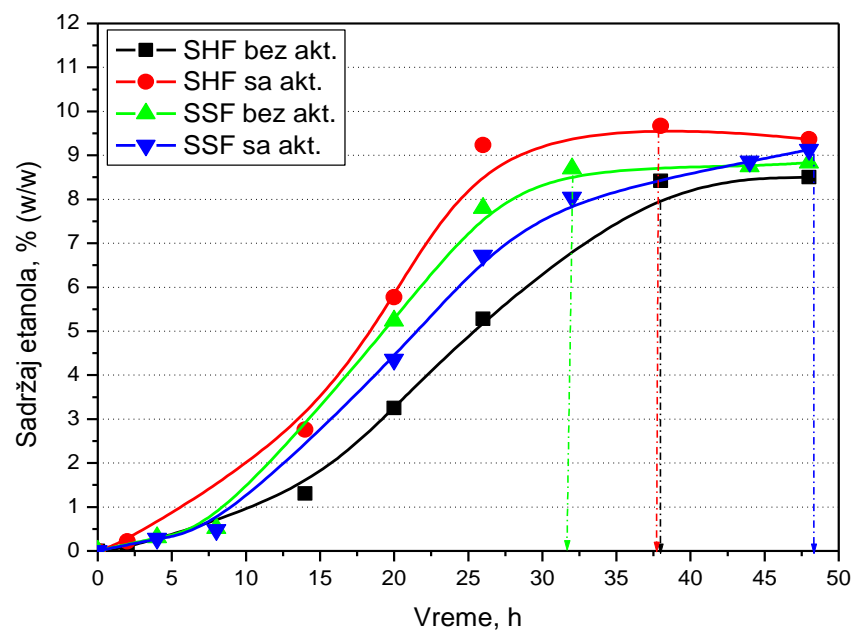
Slika 5.22. Promena broja ćelija kvasca u toku SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez dodatka mineralnih soli. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.17. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3 g/l) i  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2 g/l). Puna linija- sa dodatkom aktivatora, isprekidna linija – kontrola (bez dodatka aktivatora).

Na slici 5.21. se može videti da je trend rasta sadržaja etanola tokom SSF procesa drugačiji prilikom obogaćivanja hidrolizata mineralnim solima u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Dodatkom aktivatora sadržaj etanola do 44 h SSF procesa je bio niži u poređenju sa kontrolom, ali nakon toga je usledio porast, i postignuto je povećanje sadržaja etanola od 3,35% (u odnosu na kontrolu) nakon 48 h SSF procesa. U skladu sa prikazanim trendom rasta sadržaja etanola, ako bi se produžio SSF proces verovatno bi se postigao i veći porast etanola u odnosu na kontrolu. Međutim, produženje procesa bi podrazumevalo i povećanje troškova i smanjenje produktivnosti proizvodnje pa je neophodno uskladiti vreme trajanja procesa i moguće povećanje sadržaja etanola. Naime, kao što je već napomenuto, kod kontrolnog uzorka bez dodatka aktivatora SSF proces se može skratiti na 32 h, kada se dobijaju visoke vrednosti procesnih parametara: sadržaj etanola od 8,70% i volumetrijska produktivnost od 2,72 g/l·h (tabela 5.16.). Dodatkom mineralnih soli najveće vrednosti procesnih parametara se dobijaju tek nakon 48 h i iznose: sadržaj etanola od 9,13% i volumetrijska produktivnost od 1,90 g/l·h (tabela 5.17.). Na osnovu kinetike prikazane na slici 5.21. produženjem vremena trajanja SSF procesa postigle bi se više vrednosti sadržaja etanola ali bi se smanjila produktivnost procesa. Na osnovu ovog, predlaže se izvođenje SSF procesa bez dodatka aktivatora, jer obogaćivanje hidrolizata aktivatorima podrazumeva povećanje troškova i neophodno produžavanje vremena trajanja SSF procesa. Porast sadržaja etanola (od 3,35% u odnosu na kontrolu) i produktivnosti (od 3,26% u odnosu na kontrolu) nakon 48 h SSF procesa sa dodatkom mineralnih soli nije zadovoljavajući.

Na slici 5.22. se uočava povećanje broja ćelija u toku eksponencijalne faze rasta kvasca kod uzorka sa dodatkom mineralnih soli u poređenju sa kontrolom, ali i ranije počinje faza odumiranja ćelija kvasca. Faza odumiranja ćelija kod kontrolnog uzorka počinje tek nakon 44 h SSF procesa. Na kraju fermentacije broj ćelija je u oba slučaja (sa i bez dodatka aktivatora) sličan  $\sim 4,5 \cdot 10^7$  CFU/ml, jer kao što je prikazano na slici 5.20., dodatak mineralnih soli nije značajno uticao na povećanje broja ćelija.

### 5.2.3.5. Poređenje SHF (odvojena saharifikacija i fermentacija) i SSF (simultana saharifikacija i fermentacija) procesa kukuruznog brašna, sa i bez dodatka aktivatora kvasca

U ovom poglavlju sumirani su rezultati dobijeni u prethodnim eksperimentima tokom SHF (odvojene saharifikacije i fermentacije) i SSF (simultane saharifikacije i fermentacije) procesa, sa i bez dodatka aktivatora kvasca, u cilju izbora najoptimalnijeg postupka proizvodnje etanola sa slobodnim ćelijama kvasca. Na slici 5.23. prikazana je promena sadržaja etanola pri optimalnim vrednostima parametara za svaki proces. U tabeli 5.18. prikazane su vrednosti svih značajnih procesnih parametara postignutih tokom SHF i SSF procesa sa i bez dodatka aktivatora pri istim procesnim uslovima (kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata) i nakon optimalnog vremena trajanja svakog procesa koji je određen u prethodnim eksperimentima.



Slika 5.23. Kinetika proizvodnje etanola tokom SHF i SSF procesa kukuruznog brašna, sa i bez dodatka najoptimalnije kombinacije aktivatora za svaki proces. Uslovi procesa: likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$  (v/w), brzina mešanja  $v=150\text{ rpm}$ ; SHF proces - saharifikacija -  $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=4\text{ h}$ ,  $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$  (v/w), fermentacija -  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ , količina inokuluma 2% (v/v), aktivatori - Ca-pantotenat (2 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l) i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l); SSF proces -  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$  (v/w), količina inokuluma 2% (v/v), brz. mešanja  $v=100\text{ rpm}$ , aktivatori -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l) i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l). Strelice pokazuju izabrano optimalno vreme trajanja svakog procesa.

Tabela 5.18. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih tokom SHF i SSF procesa kukuruznog brašna, sa i bez dodatka aktivatora, pri optimalnom vremenu trajanja svakog procesa.

Parametar	Proces			
	SHF bez akt.	SHF sa akt.	SSF bez akt.	SSF sa akt.
<b>Optimalno vreme trajanja procesa, h</b>	38	38	32	48
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	8,42	9,67	8,70	9,13
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,44	0,50	0,45	0,48
<b>Procenat od teor. sadrž. etanola, %</b>	77,46	88,96	80,04	83,99
<b>Vol. produktivnost P, g/l·h<sup>h</sup></b>	2,21	2,54	2,72	1,90
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	99,09	93,69	78,75	99,19

Uslovi svakog procesa su kao na slici 5.23.

<sup>h</sup> Vol. produktivnost je izračunavana nakon optimalnog vremena trajanja svakog procesa prikazanog u datoj tabeli

Na osnovu slike 5.23. i tabele 5.18. može se videti da se najviši sadržaj etanola i procenat od teorijskog sadržaja etanola postižu kod SHF procesa sa dodatkom aktivatora (mineralnih soli i vitamina). Međutim, nedostaci ovog procesa su povećanje troškova proizvodnje zbog visoke cene korišćenih aktivatora i vremena trajanja procesa od 38 h. Nasuprot tome, tokom SSF procesa bez dodatka aktivatora postiže se najviša volumetrijska produktivnost, kao i vrlo visoke vrednosti ostalih procesnih parametara, a optimalno vreme trajanja procesa iznosi 32 h. I pored toga što se ne dobija maksimalna vrednost sadržaja etanola u ovom procesu, mora se uzeti u obzir i činjenica da je združivanjem faza saharifikacije i fermentacije već na početku postignuto skraćanje vremena procesa za 4 h koliko traje faza saharifikacije, i da je optimalna temperatura SSF procesa 30 °C (što je niža temperatura od one potrebne za saharifikaciju, 55°C), pa se samim tim postižu velike uštede energije tokom ovog procesa i povećava efikasnost proizvodnje etanola. Prema tome, SSF proces zajedno sa fazom likvefakcije traje 33 h, dok SHF proces sa fazama likvefakcije i saharifikacije traje 43 h. Takođe, kod SSF procesa se smanjuje mogućnost

pojave inhibicije enzima proizvodom, odnosno glukozom, s obzirom da kvasac odmah koristi nastalu glukozu kao hranu. Optimizacijom ovih procesa ustanovljeno je da je u proizvodnji etanola iz kukuruznog brašna pomoću slobodnih ćelija kvasca ekonomski najpovoljniji i najefikasniji SSF proces bez dodatka aktivatora sa sledećim postignutim procesnim parametrima: vreme trajanja od 32 h, sadržaj etanola od 8,70% (w/w), prinos etanola od 0,45 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 80,04%, volumetrijska produktivnost od 2,72 g/l-h i potrošnja glukoze od 78,75%.

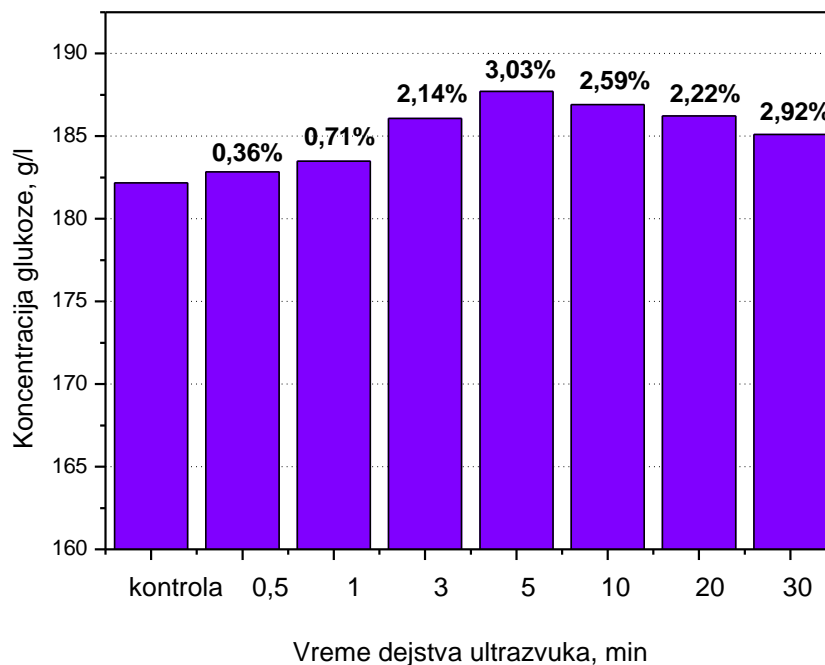
U radu Montesinos-a i Navarro-a [186] SSF proces iz pšeničnog brašna se takođe pokazao kao superiorniji u poređenju sa SHF procesom (pri istim procesnim uslovima) s obzirom da je postignut viši prinos etanola i značajno skraćenje vremena trajanja procesa. Optimalno vreme trajanja SSF procesa u njihovom radu je iznosilo 30 h. SSF proces se pokazao kao ekonomski povoljniji proces u smislu uštede energije i povećanja efikasnosti proizvodnje etanola i u radovima mnogih drugih autora [65, 68, 69, 159, 206-208].

#### ***5.2.3.6. Uticaj ultrazvuka kao predtretmana na poboljšanje kvaliteta hidrolizata kukuruznog brašna i proizvodnju etanola tokom SSF procesa***

##### *5.2.3.6.1. Uticaj vremena dejstva ultrazvuka na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna*

Ovaj set eksperimenata izvođen je radi određivanja uticaja vremena dejstva ultrazvuka na koncentraciju glukoze nakon završene dvojno-enzimske hidrolize koja je izvođena pri optimalnim vrednostima parametara određenim u prethodnim eksperimentima (hidromodul 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w)). Nakon pripreme, suspenzije kukuruznog brašna su izlagane dejstvu ultrazvuka u toku različitog vremena i na sobnoj temperaturi, zatim je dodat enzim Termamyl SC i nastavljen je proces enzimske hidrolize (likvefakcija i saharifikacija). Ispitivana vremena dejstva ultrazvuka su: 0,5, 1, 3, 5, 10, 20 i 30 min. Predtretman pripremljenih suspenzija ultrazvukom je vršen u ultrazvučnom kupatilu, pri frekvenciji ultrazvučnih talasa od 40 kHz. Istovremeno je urađen i kontrolni uzorak koji

nije izlagan dejstvu ultrazvuka, pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 5.24.



Slika 5.24. Uticaj vremena dejstva ultrazvuka na promenu koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna. Uslovi procesa: soniciranje –  $v=40$  kHz,  $t=t_{sob}$ ; hidromodul 1:3, brzina mešanja  $v=150$  rpm, likvefakcija -  $t=85$  °C,  $pH=6$ ,  $\tau=1$  h,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w); saharifikacija -  $t=55$  °C,  $pH=5$ ,  $\tau=4$  h,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w). Brojevi iznad stubova predstavljaju procenat uvećanja koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak.

Na osnovu slike 5.24. može se uočiti da je u svim uzorcima došlo do povećanja koncentracije glukoze nakon enzimske hidrolize u odnosu na kontrolni uzorak. Najveći porast koncentracije glukoze (3,03% u odnosu na kontrolni uzorak) je ostvaren prilikom izlaganja suspenzije kukuruznog brašna dejstvu ultrazvuka u toku 5 min, kada je koncentracija glukoze nakon enzimske hidrolize iznosila 187,70 g/l. Takođe se može videti da sa povećanjem vremena dejstva ultrazvuka raste i koncentracija nastale glukoze, međutim prilikom dužeg izlaganja dejstvu ultrazvuka (10, 20 i 30 min) uočava se blagi pad u koncentraciji glukoze. To se može objasniti time što je produženje vremena dejstva ultrazvuka dovelo do povećanja koncentracije glukoze na početku enzimske hidrolize, ali



je na kraju enzimske hidrolize moguća pojava inhibicije enzima visokom koncentracijom glukoze kao proizvoda.

Na osnovu prikazanih rezultata izabrano je optimalno vreme dejstva ultrazvuka od 5 min. Međutim, potrebno je ispitati kada je najoptimalnije izlagati uzorak delovanju ultrazvuka u odnosu na dodatak enzima Termamyl SC, odnosno ispitati da li ultrazvuk deluje i na aktivnost ovog enzima. Prema tome, u daljim eksperimentima uzorci su izlagani dejstvu ultrazvuka u toku 5 min, i to: nakon dodatka enzima Termamyl SC (uzorak 3.), i 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC (uzorak 4.). Dobijeni rezultati su upoređeni sa uzorkom 2. koji je tretiran 5 min pre dodatka enzima Termamyl SC u prethodnom eksperimentu (slika 5.24.), i prikazani su u tabeli 5.19. Istovremeno je urađen i kontrolni uzorak (uzorak 1.) koji nije izlagan dejstvu ultrazvuka, pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata.

Tabela 5.19. Uticaj vremena dejstva ultrazvuka na koncentraciju glukoze nakon dvojnogenske hidrolize kukuruznog brašna

<b>Broj uzorka</b>	<b>Vreme dejstva ultrazvuka, min</b>	<b>Koncentracija glukoze, g/l</b>	<b>Uvećanje koncentracije glukoze u odnosu na kontrolu, %</b>
1	0	182,18	-
2	5	187,70	3,03
3	5	185,23	1,67
4	2,5 + 2,5	190,30	4,46

Uslovi procesa su isti kao na slici 5.24.

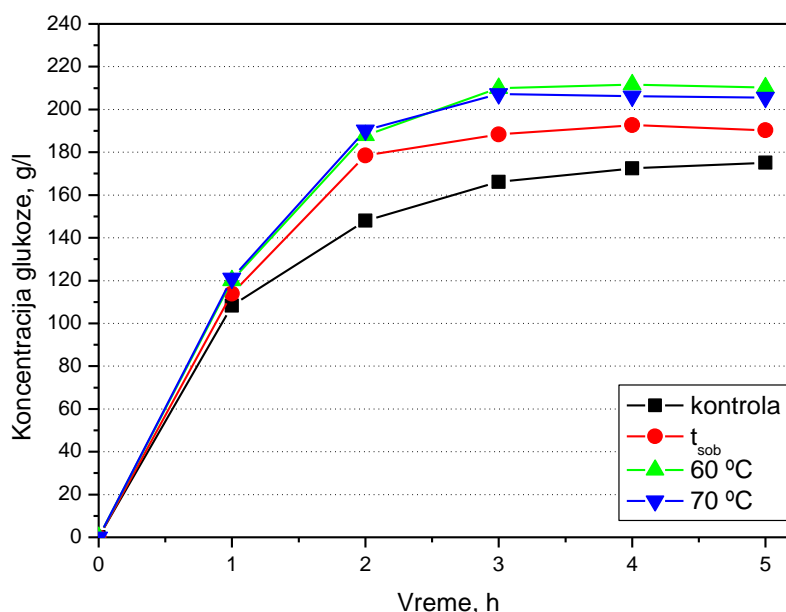
Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.19. može se videti da je optimalno vreme delovanja ultrazvuka 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC, kada se postiže maksimalni porast koncentracije glukoze od 4,46% u odnosu na kontrolni uzorak. Najmanja koncentracija glukoze postignuta je dejstvom ultrazvuka od 5 min nakon dodatka enzima Termamyl SC (uzorak 3.), što se može objasniti time da je ultrazvuk delovao i na delimičnu inaktivaciju enzima. U literaturi je zabeleženo da ultrazvučni predtretman može i da degradira i denaturiše enzime zbog lokalnog zagrevanja, sonohemijskih reakcija i intenzivnih sila smicanja ukoliko su enzimi dodati pre sonikacije

[102]. Samim tim, smatra se da enzimi dodati tokom sonifikacije dovode do manjeg oslobađanja glukoze nego dodatak enzima posle sonifikacije [97, 98].

U radu Khanal-a i saradnika [97] ispitivana je primena ultrazvuka kao predtretmana u poboljšanju otpuštanja glukoze tokom enzimske hidrolize kukuruznog brašna. Pri radnoj frekvenciji od 20 kHz, sobnoj temperaturi i vremenu soniciranja od 20 i 40 s postignuto je povećanje koncentracije glukoze tokom enzimske hidrolize u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Ovo je objašnjeno pozitivnim uticajem ultrazvuka na smanjenje dimenzija čestica skroba, bolje mešanje usled akustičnih kavitacija i mikrostrujanja i na otpuštanje dodatnog skroba koji je vezan za lipide. Maksimalno povećanje koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak iznosilo je 32%, što je znatno veći porast koncentracije glukoze u odnosu na kontrolu nego u ovom radu (tabela 5.19.), najverovatnije zbog toga jer su u toku soniciranja korišćeni i ultrazvučni talasi visoke, srednje i niske snage. Kao i u ovom radu, u pojedinim uzorcima (koji su izlagani ultrazvučnim talasima visoke snage) došlo je do smanjenja krajnje koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak (smanjenje od 11-22%) što su objasnili degradacijom i denaturacijom enzima tokom predtretmana ultrazvučnim talasima visoke snage. I u radu Shewale-a i Pandit-a [104] primena ultrazvuka je pozitivno uticala na povećanje dekstroznog ekvivalenta nakon završene enzimske hidrolize brašna sirka, od 10-25% u zavisnosti od vremena delovanja i inteziteta ultrazvuka. Ovo su objasnili oslobađanjem dodatnih granula skroba iz matriksa proteina pod dejstvom akustičnih kavitacija izazvanih ultrazvukom. Ove dodatne oslobođene granule skroba se geliraju i bivaju dostupne za dalju likvefakciju i saharifikaciju. Oni su takođe utvrdili da je predtretman ultrazvukom uticao na poboljšanje filtracionih osobina hidrolizata i bolju razgradnju zrna skroba usled akustičnih kavitacija.

### 5.2.3.6.2. Uticaj dejstva ultrazvuka na kinetiku enzimske hidrolize kukuruznog brašna pri optimalnom vremenu i različitoj temperaturi soniciranja

Ovaj set eksperimenata vođen je u cilju ispitivanja uticaja temperature soniciranja na kinetiku dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna pri optimalnom vremenu dejstva ultrazvuka određenom u prethodnim eksperimentima. U tu svrhu ispitivane su tri radne temperature: sobna temperatura, 60 i 70 °C. Koncentracija glukoze je merena na svakih sat vremena u toku 5 h dvojno-enzimske hidrolize. Dobijeni rezultati su upoređeni sa kontrolnim uzorkom koji nije izlagan dejstvu ultrazvuka, i prikazani su na slici 5.25.



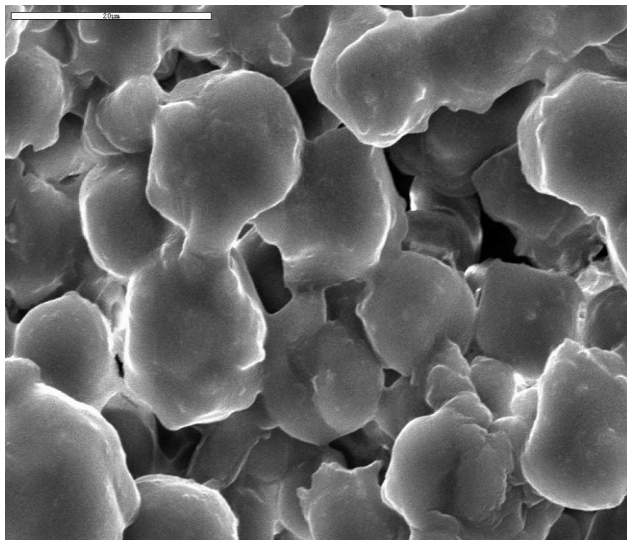
Slika 5.25. Uticaj temperature soniciranja na kinetiku dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna pri optimalnom vremenu dejstva ultrazvuka. Uslovi procesa: soniciranje –  $\nu=40$  kHz,  $\tau=2,5+2,5$  min, hidromodul 1:3; parametri dvojno-enzimske hidrolize su kao na slici 5.24.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 5.25. uočava se porast koncentracije glukoze u svim uzorcima koji su izlagani dejstvu ultrazvuka u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Takođe, može se videti da se sa povećanjem temperature soniciranja povećava koncentracija nastale glukoze tokom dvojno-enzimske hidrolize. Trend porasta koncentracije glukoze je bio sličan do 3 h dvojno-enzimske hidrolize pri temperaturama

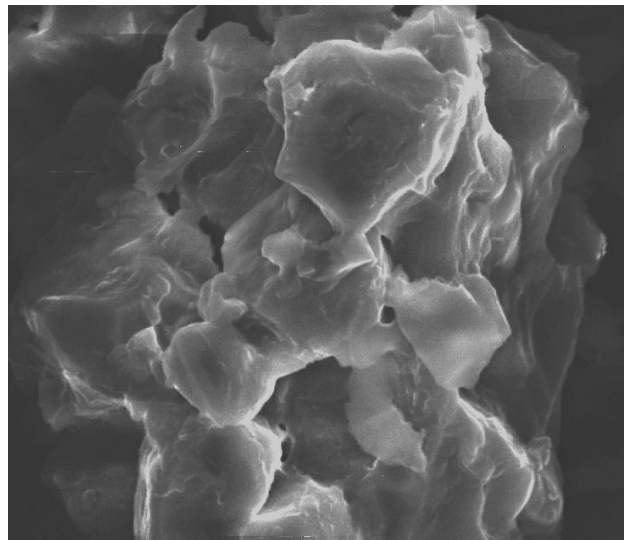
soniciranja od 60 i 70 °C. Međutim, nakon 3 h više vrednosti koncentracije glukoze su dostignute kada je temperatura soniciranja bila 60 °C. Potrebno je istaći da pri temperaturama 60 i 70 °C nakon 4 h enzimске hidrolize dolazi čak do pada koncentracije glukoze usled pojave inhibicije enzima visokom koncentracijom glukoze (produktom). Ta inhibicija je izraženija na temperaturi soniciranja od 70 °C jer se postižu niže koncentracije glukoze posle 3 h enzimске hidrolize nego na temperaturi soniciranja od 60 °C. Takođe, posmatrajući tok enzimске hidrolize pri ovim radnim temperaturama može se videti da je moguće i skratiti vreme hidrolize na 3 h. Na osnovu ovih rezultata smatra se da je optimalna temperatura soniciranja od 60 °C s obzirom da su u tom slučaju dobijene najviše vrednosti koncentracije glukoze tokom enzimске hidrolize. U ovom slučaju koncentracija glukoze nakon 5 h enzimске hidrolize je iznosila 210,19 g/l, što predstavlja povećanje koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak od 15,37%.

Khanal i saradnici [97] su ispitivali primenu ultrazvuka kao predtretmana pri različitim temperaturama soniciranja i utvrdili da se pri dejstvu ultrazvuka male snage i vremena dejstva od 40 s sa povećanjem temperature soniciranja do 5 °C povećava otpuštanje glukoze za 27%.

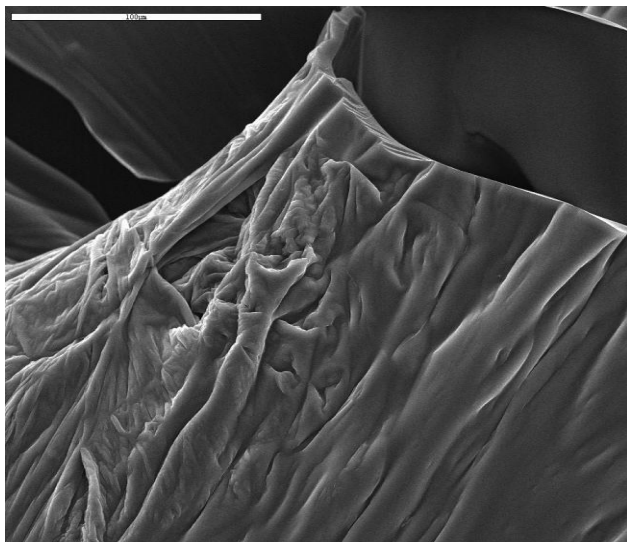
Kako bi se potpunije ispitaio uticaj dejstva ultrazvuka na zrna skroba u kukuruznom brašnu i samim tim na povećanje prinosa glukoze tokom dvojno-enzimске hidrolize, na slici 5.26. su prikazane SEM slike: a) suspenzije kukuruznog brašna i vode pre početka hidrolize i bez dejstva ultrazvuka (uvećanje 2000×), b) kontrolnog uzorka (bez dejstva ultrazvuka) nakon likvefakcije (uvećanje 500×), c) kontrolnog uzorka nakon saharifikacije (uvećanje 100×), d) uzorka tretiranog ultrazvukom (na 60 °C) 2,5 min pre dodatka enzima Termamyl SC (uvećanje 2000×), e) uzorka tretiranog ultrazvukom (na 60 °C) nakon likvefakcije (uvećanje 100×) i f) uzorka tretiranog ultrazvukom (na 60 °C) nakon saharifikacije (uvećanje 100×). Radni napon je iznosio 20 kV.



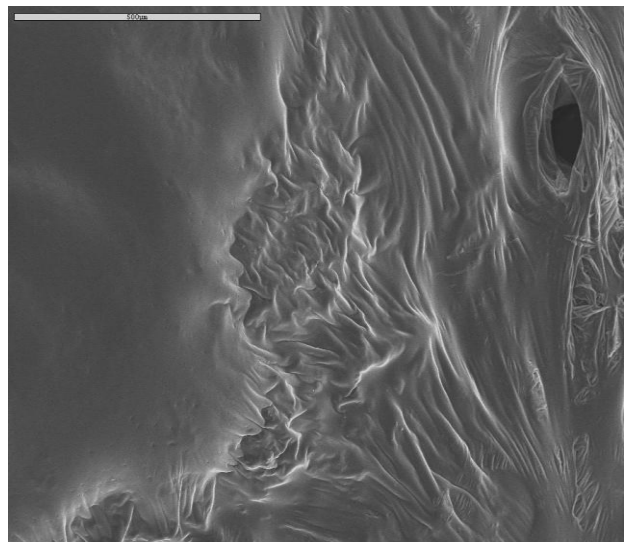
(a)



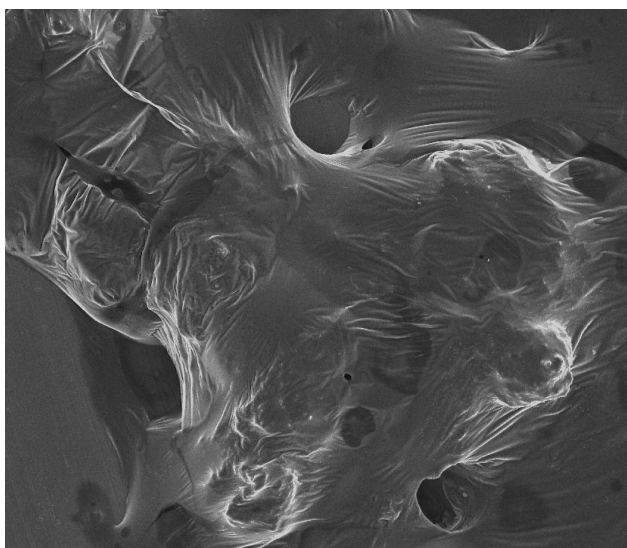
(d)



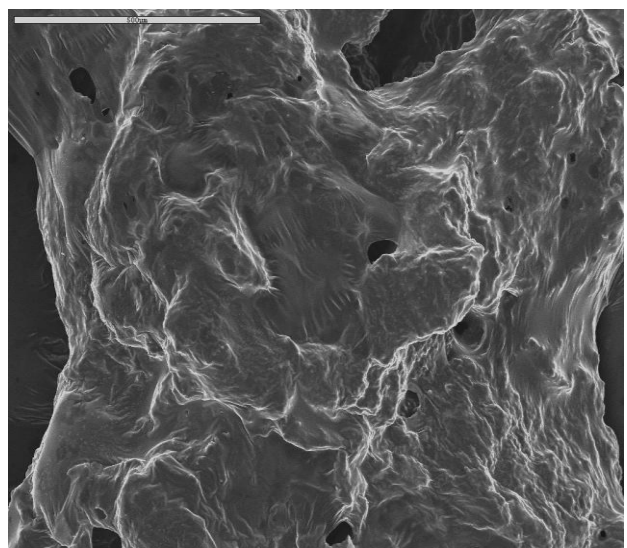
(b)



(e)



(c)



(f)

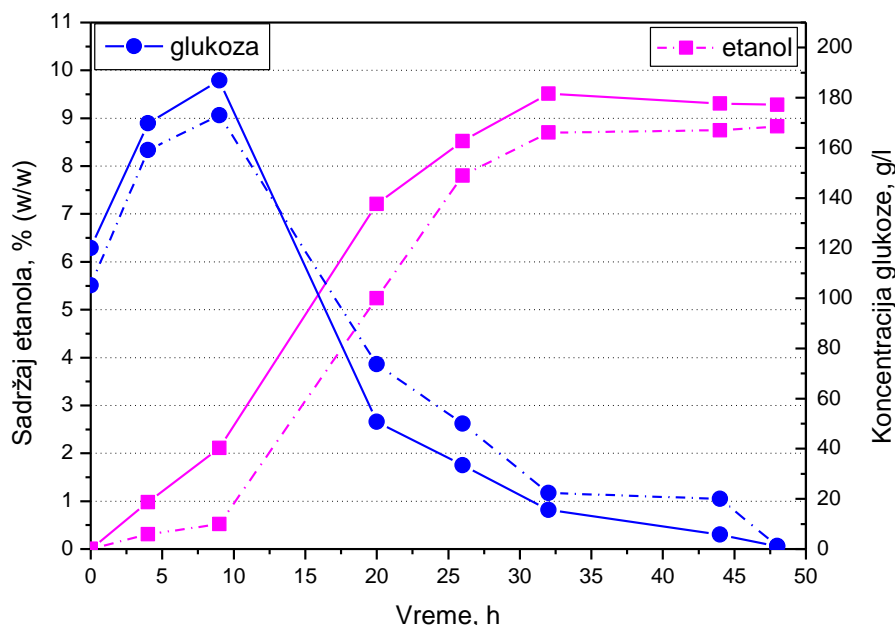
Slika 5.26. SEM slike kukuruzne suspenzije: a) suspenzija kukuruznog brašna i vode pre početka hidrolize i bez dejstva ultrazvuka, b) kontrolni uzorak (bez dejstva ultrazvuka) nakon likvefakcije, c) kontrolni uzorak (bez dejstva ultrazvuka) nakon saharifikacije, d) uzorak tretiran ultrazvukom 2,5 min pre dodatka enzima Termamyl SC, e) uzorak tretiran ultrazvukom nakon likvefakcije i f) uzorak tretiran ultrazvukom nakon saharifikacije. Uslovi soniciranja:  $t=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau=2,5+2,5\text{ min}$ ,  $v=40\text{ kHz}$ . Uslovi izvođenja dvojno-enzimske hidroliza su kao na slici 5.24.

Poređenjem slika 5.26. a) i d) može se videti da je ultrazvuk i pre dodatka enzima Termamyl SC uticao na razgradnju zrna skroba. Na slici 5.26. a) zrna skroba su ovalnog oblika veličine oko  $25\text{ }\mu\text{m}$ , dok se na slici 5.26 d) može videti da je dejstvom ultrazvuka došlo do razaranja strukture zrna skroba što značajno utiče i na brže oslobađanje skroba tokom hidrolize, skraćenje vremena potrebnog za formiranje gela i samim tim na povećanje prinosa glukoze. Ukoliko se uporede slike 5.26. b) i e) može se uočiti da je u uzorku tretiranom ultrazvukom došlo do bržeg utečnjavanja kukuruzne suspenzije u odnosu na kontrolni uzorak s obzirom da je postignuta bolja razgradnja zrna skroba i pre početka enzimske hidrolize. Na slikama 5.26. c) i f) može se videti da je nakon završene saharifikacije na površini nerazgrađenih skrobnih zrnaca formiran tanak film (najverovatnije oslobođenih šećera i drugih jedinjenja u rastvoru). S obzirom da je dejstvo ultrazvuka imalo pozitivan efekat na razgradnju skroba, na slici 5.26. f) se može uočiti da je veličina skrobnih zrnaca znatno manja nego u kontrolnom uzorku prikazanom na slici 5.26. c).

#### *5.2.3.6.3. Uticaj dejstva ultrazvuka kao predtretmana na kinetiku SSF procesa pri optimalnom vremenu i temperaturi dejstva ultrazvuka*

Nakon utvrđivanja optimalnih parametara za dejstvo ultrazvuka kao predtretmana (vreme od  $2,5+2,5\text{ min}$ , temperatura od  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ispitivana je proizvodnja etanola tokom SSF procesa bez dodatka aktivatora. U prethodnim eksperimentima (odjeljak 5.2.3.5.) ovaj proces je izabran kao ekonomski najpovoljniji i najefikasniji u proizvodnji etanola iz kukuruznog brašna pomoću slobodnih ćelija kvasca. SSF proces je vođen pri optimalnim parametrima procesa određenim u prethodnim eksperimentima (odjeljak 5.2.3.4.). Sadržaj etanola, koncentracija glukoze i broj ćelija kvasca određivani su nakon 4, 8, 20, 26, 32, 44 i 48 h SSF procesa. Proizvodnja etanola, potrošnja glukoze i promena broja ćelija kvasca u

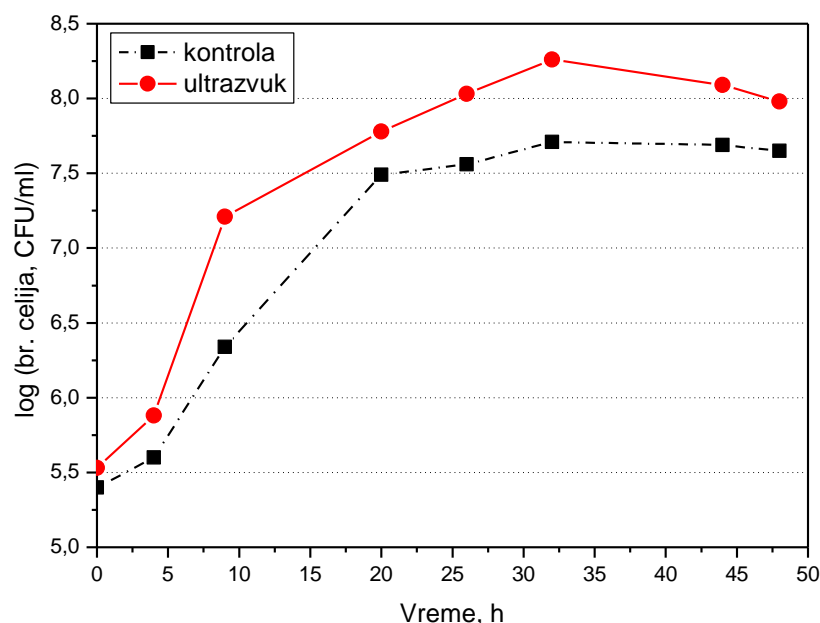
toku 48 h SSF procesa bez dodatka aktivatora i uz predtretman ultrazvukom upoređeni su sa kontrolnim uzorkom (bez dejstva ultrazvuka), i prikazani su na slikama 5.27. i 5.28.



Slika 5.27. Kinetika proizvodnje etanola i potrošnje glukoze tokom SSF procesa kukuruznog brašna bez dodatka aktivatora uz predtretman ultrazvukom pri optimalnim parametrima soniciranja. Uslovi procesa: soniciranje –  $v=40$  kHz,  $\tau=2,5+2,5$  min,  $t=60$  °C; likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85$  °C,  $pH=6$ ,  $\tau=1$  h,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w), brz. mešanja  $v=150$  rpm; SSF proces -  $t=30$  °C  $pH=5$ ,  $\tau=48$  h, brz. mešanja  $v=100$  rpm,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w), količina inokuluma 2% (v/v). Puna linija – uzorak tretiran ultrazvukom, isprekidana linija – kontrolni uzorak (bez dejstva ultrazvuka).

Na slici 5.27. se može videti da je trend porasta sadržaja etanola tokom SSF procesa sličan i kod uzorka tretiranog ultrazvukom i kod kontrolnom uzorku. Viši sadržaj etanola tokom SSF procesa postignut je kod uzorka tretiranog ultrazvukom s obzirom da je početna koncentracija glukoze u tom slučaju bila veća (120 g/l) nego u kontrolnom uzorku, a i dejstvo ultrazvuka je pogodovalo bržoj razgradnji granula skroba u kukuruznom brašnu. Maksimalan sadržaj etanola postignut je nakon 32 h i iznosio je 9,51% (w/w), što predstavlja porast sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak od 9,31%. Takođe, na slici 5.27. zapaženo je povećanje koncentracija glukoze na početku SSF procesa (u prvih 8 h) kod uzoraka i sa i bez predtretmana ultrazvukom, ukazujući na to da je brzina hidrolize skroba dejstvom glukoamilaze bila veća od brzine potrošnje glukoze od strane ćelija

kvasca. U skladu sa ovim, nije uočena ni značajna proizvodnja etanola na početku SSF procesa. Nakon 8 h procesa vrednosti koncentracije glukoze su opadale tokom SSF procesa. Kod uzorka tretiranog ultrazvukom postignuta je niža krajnja koncentracija glukoze u odnosu na kontrolni uzorak i iznosila je 0,98 g/l (što odgovara potrošnji glukoze tokom SSF procesa od 99,18%). Potrebno je naglasiti da je prednost upotrebe ultrazvuka i u tome što obezbeđuje efikasnije mešanje (usled akustičnog strujanja) koje omogućava bolji prenos toplote unutar suspenzije [97, 98, 102].



Slika 5.28. Promena broja ćelija kvasca u toku SSF procesa kukuruznog brašna bez dodatka aktivatora uz predtretman ultrazvukom pri optimalnim parametrima soniciranja. Uslovi procesa su kao na slici 5.27. Puna linija – uzorak tretiran ultrazvukom, isprekidana linija – kontrolni uzorak (bez dejstva ultrazvuka).

Na slici 5.28. se može se da se kod uzorka tretiranog ultrazvukom postiže veći broj ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta kvasca u poređenju sa kontrolom, ali i ranije započinje faza odumiranja ćelija kvasca (nakon 32 h). Faza odumiranja ćelija kod kontrolnog uzorka počinje tek nakon 44 h SSF procesa. Ovo se može objasniti inhibicijom ćelija kvasca proizvodom, odnosno visokom koncentracijom etanola koja dostiže svoju maksimalnu vrednost upravo u 32 h SSF procesa. Maksimalan broj ćelija od  $1,18 \cdot 10^8$  CFU/ml u uzorku tretiranom ultrazvukom dostignut je nakon 32 h SSF procesa.



Na osnovu slika 5.27. i 5.28. može se videti da se uspešno može skratiti vreme SSF procesa uz predtretman ultrazvukom na 32 h, kao što je to slučaj kod SSF procesa kontrolnog uzorka (odjeljak 5.2.3.4.1.). U ovom slučaju, postiže se maksimalan sadržaj etanola od 9,51% (w/w), maksimalan broj ćelija od  $1,18 \cdot 10^8$  CFU/ml, i veoma niska vrednost koncentracije glukoze od 15,56 g/l. U tabeli 5.20. prikazane su vrednosti ostalih procesnih parametara dobijenih prilikom izvođenja SSF procesa sa i bez predtretmana ultrazvukom nakon 32 h.

Tabela 5.20. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 32 h SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez predtretmana ultrazvukom

<b>Parametar</b>	<b>Kontrola (bez dejstva ultrazvuka)</b>	<b>SSF proces uz predtretman ultrazvukom</b>
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	8,70	9,51
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,45	0,50
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	80,04	87,48
<b>Vol. produktivnost P,g/l·h</b>	2,72	2,97
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	78,75	87,03

Uslovi procesa su kao na slici 5.27.

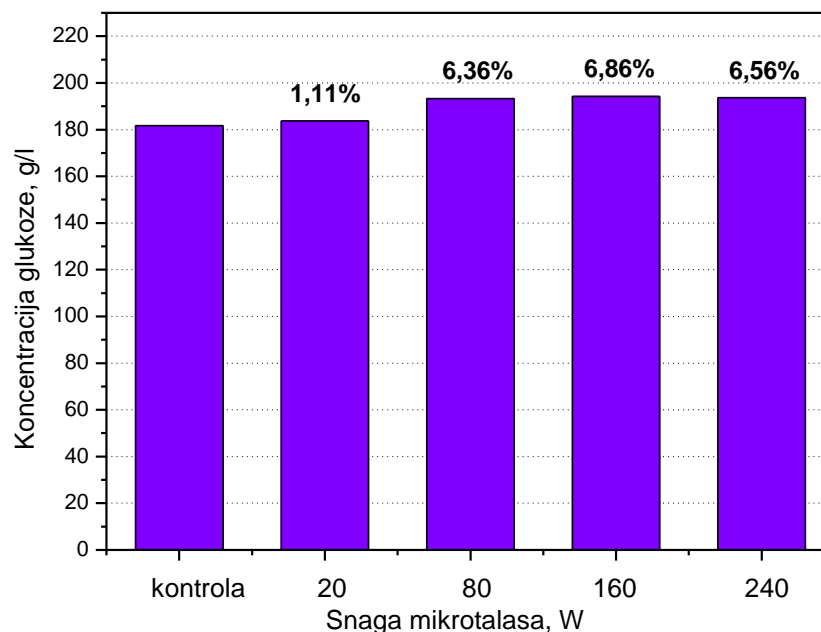
Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.20. može se videti da se SSF proces uz predtretman ultrazvukom pokazao kao superiorniji u odnosu na SSF proces bez primene predtretmana ultrazvukom u smislu postizanja viših vrednosti svih procesnih parametara i uštede energije usled skraćanja vremena izvođenja procesa na 32 h. Takođe se može videti da je primenom predtretmana ultrazvukom povećan maksimalan sadržaj etanola koji se postiže nakon 32 h SSF procesa za 9,31% u odnosu na kontrolni uzorak. Međutim, s druge strane implementacija predtretmana ultrazvukom podrazumeva sagledavanje i pozitivnih i negativnih strana primene ove tehnologije. Naime, potrebno je usaglasiti postignute visoke vrednosti procesnih parametara i uspostavljene optimalne uslove procesa sa visokom potrošnjem energije tokom soniciranja. Sam postupak soniciranja zahteva veliki utrošak

energije, a u ovom radu postoji dodatna potrošnja energije s obzirom da je optimalna temperatura soniciranja 60 °C.

### ***5.2.3.7. Uticaj mikrotalasa kao predtretmana na poboljšanje kvaliteta hidrolizata kukuruznog brašna i proizvodnju etanola tokom SSF procesa***

#### ***5.2.3.7.1. Uticaj snage mikrotalasa na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna***

Ovaj set eksperimenata vršen je radi ispitivanja uticaja mikrotalasa različite snage na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna koja je izvođena pri optimalnim vrednostima parametara određenim u prethodnim eksperimentima (hidromodul 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w)). Suspenzijama kukuruznog brašna prvo je dodat enzim Termamyl SC, a zatim su izlagane dejstvu mikrotalasa različite snage u toku 4 min, i nastavljen je proces enzimske hidrolize (likvefakcija i saharifikacija). Ispitivane vrednosti snage mikrotalasa su: 20, 80, 160 i 240 W. Temperature u uzorcima na kraju predtretmana mikrotalasima iznosile su 68 (20 W), 96 (80 W), 105 (160 W) i 122 °C (240 W). Predtretman pripremljenih suspenzija mikrotalasima je vršen u mikrotalasnoj peći. Istovremeno je urađen i kontrolni uzorak koji nije izlagan dejstvu mikrotalasa, pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 5.29.



Slika 5.29. Uticaj snage mikrotalasa na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna. Uslovi procesa: predtretman mikrotalasila vršen je u toku 4 min nakon dodatka enzima Termamyl SC, temperature u uzorcima na kraju tretiranja mikrotalasila iznosile su 68 (20 W), 96 (80 W), 105 (160 W) i 122 °C (240 W); likvefakcija - hidromodul 1:3, brzina mešanja  $v=150$  rpm,  $t=85$  °C,  $pH=6$ ,  $\tau=1$  h,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w); saharifikacija -  $t=55$  °C,  $pH=5$ ,  $\tau=4$  h,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w). Brojevi iznad stubova predstavljaju procenat uvećanja koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak.

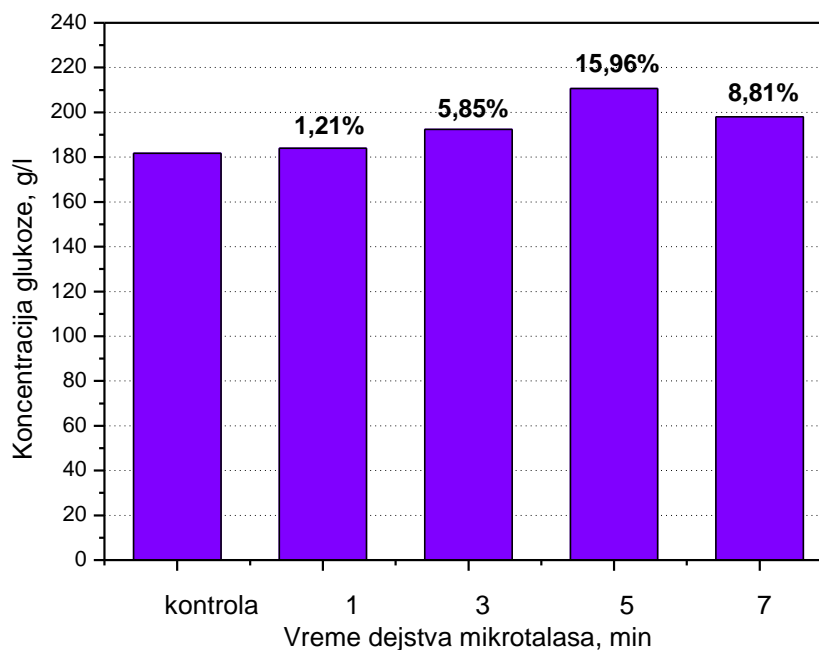
Kao što se može videti na slici 5.29. povećanje snage mikrotalasa iznad 80 W nije značajno uticalo na dalje povećanje koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize. Prema tome, ova vrednost snage mikrotalasa je izabrana kao optimalna, kada je postignuta koncentracija glukoze od 193,26 g/l (što predstavlja povećanje koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak od 6,36%).

Hu i Wen [108] su u svom radu ispitivali enzimsku hidrolizu lignocelulozne sirovine (trave) uz predtretman mikrotalasila čija je promena snage pratila promenu temperature u mikrotalasnjoj peći u opsegu od 70 do 190 °C. Oni su utvrdili da je dejstvo mikrotalasa pozitivno uticalo na povećanje koncentracije glukoze nakon enzimske hidrolize u odnosu na kontrolni uzorak. Koncentracija glukoze nakon enzimske hidrolize je rasla u celom temperaturnom opsegu: od 19,5 g/100g biomase pri 70 °C do 31,5 g/100

biomase pri temperaturi predtretmana mikrotalasima od 190 °C. Razlike koje postoje u odnosu na rezultate u ovom radu su usled različite korišćene sirovine (za razgradnju lignoceluloznih materijala potrebna je viša temperatura). Palav i Seetharaman [106] su takođe ispitivali dejstvo mikrotalasa na skrobnu suspenziju pri različitim temperaturama predtretmana u mikrotalnoj peći koje su se kretale u opsegu od 60 do 95 °C. Sa povećanjem temperature rasla je i koncentracija glukoze nakon završene enzimske hidrolize.

#### *5.2.3.7.2. Uticaj vremena dejstva mikrotalasa na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna*

Ovaj set eksperimenata izvođen je u cilju određivanja uticaja vremena dejstva mikrotalasa na koncentraciju glukoze nakon završene dvojno-enzimske hidrolize koja je izvođena pri optimalnim vrednostima parametara određenim u prethodnim eksperimentima (hidromodul 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w)). Suspenzijama kukuruznog brašna prvo je dodat enzim Termamyl SC, a zatim su izlagane dejstvu mikrotalasa snage 80 W u toku različitog vremenskog perioda, i nastavljen je proces enzimske hidrolize (likvefakcija i saharifikacija). Ispitivana vremena dejstva mikrotalasa su: 1, 3, 5 i 7 min. Predtretman pripremljenih suspenzija mikrotalasima je izvođen u mikrotalnoj peći. Istovremeno je urađen i kontrolni uzorak koji nije izlagan dejstvu mikrotalasa, pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 5.30.



Slika 5.30. Uticaj vremena dejstva mikrotalasa na promenu koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna. Uslovi procesa: predtretman mikrotalasila snage 80 W vršen je nakon dodatka enzima Termamyl SC; ostali eksperimentalni uslovi su isti kao na slici 5.29. Brojevi iznad stubova predstavljaju procenat uvećanja koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak.

Na slici 5.30. može se videti da sa porastom vremena dejstva, od 1 do 5 min, raste i koncentracija glukoze nakon završene enzimske hidrolize, međutim dejstvom mikrotalasa od 7 min dolazi do pada koncentracije glukoze usled pojave inhibicije enzima visokom koncentracijom glukoze ili delimičnom inaktivacijom enzima zbog dugog izlaganja visokoj temperaturi tokom predtretmana mikrotalasila. Vreme dejstva mikrotalasa od 5 min je izabrano kao optimalno, s obzirom da je u tom slučaju postignuta maksimalna koncentracija glukoze nakon enzimske hidrolize od 197,11 g/l (što odgovara povećanju koncentracije glukoze od 8,48% u odnosu na kontrolni uzorak). Slično ovim rezultatima, relativno kratko trajanje predtretmana mikrotalasila izabrano je i od strane drugih istraživača, kao vreme dovoljno da se postigne bubrenje i geliranje granula skroba a i razaranje kristalne strukture skroba [105, 106, 209].

Međutim, potrebno je ispitati i kada je optimalno izlagati uzorak delovanju mikrotalasa u odnosu na dodatak enzima Termamyl SC, odnosno ispitati da li mikrotalasi deluju i na aktivnost ovog enzima. Prema tome, u daljim eksperimentima uzorci su izlagani dejstvu mikrotalasa u toku 5 min, i to: pre dodatka enzima Termamyl SC (uzorak 3.), i 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC (uzorak 4.). Dobijeni rezultati su upoređeni sa uzorkom 2. koji je tretiran 5 min nakon dodatka enzima Termamyl SC u prethodnom eksperimentu (slika 5.30.), i prikazani su u tabeli 5.21. Istovremeno je urađen i kontrolni uzorak (uzorak 1.) koji nije izlagan dejstvu mikrotalasa, pod istim eksperimentalnim uslovima.

Tabela 5.21. Uticaj vremena dejstva mikrotalasa optimalne snage na koncentraciju glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna

<b>Broj uzorka</b>	<b>Vreme dejstva ultrazvuka, min</b>	<b>Koncentracija glukoze, g/l</b>	<b>Uvećanje koncentracije glukoze u odnosu na kontrolu, %</b>
1	0	181,70	-
2	5	210,70	15,96
3	5	208,76	14,89
4	2,5 + 2,5	212,53	16,96

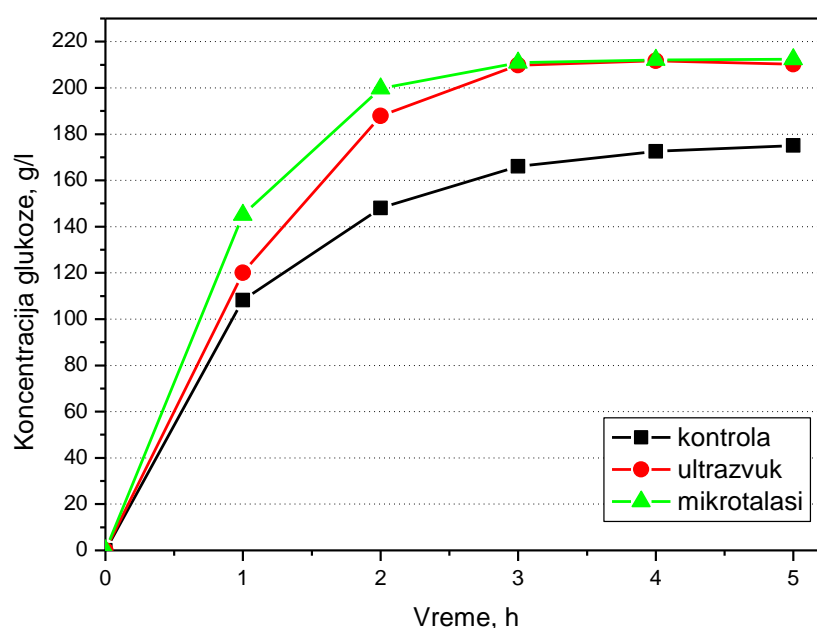
Uslovi procesa su isti kao na slici 5.30.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.21. može se videti da je optimalno vreme delovanja mikrotalasa 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC, kada se postiže maksimalni porast koncentracije glukoze od 16,95% u odnosu na kontrolni uzorak.

Poređenjem rezultata dobijenih primenom predtretmana ultrazvukom i mikrotalasa, koji su izvođeni pri optimalnim vrednostima parametara za dejstvo ultrazvuka i mikrotalasa, (slika 5.25. i tabela 5.21.), može se videti da se znatno veći porast koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni uzorak dobija primenom mikrotalasa kao predtretmana. Primenom predtretmana ultrazvukom i mikrotalasa pri optimalnim parametrima postignut je porast koncentracije glukoze nakon enzimske hidrolize u odnosu na kontrolni uzorak u iznosu od 15,37 i 16,96%, respektivno. Ovo se može objasniti primenom znatno više temperature (96 °C) koja se postiže primenom snage mikrotalasa od

80 W u odnosu na predtretman ultrazvukom koji se izvodi pri optimalnoj temperaturi od 60 °C. Viša temperatura pogoduje boljoj razgradnji strukture zrna skroba, većem otpuštanju skroba i povećanju prinosa glukoze tokom enzimske hidrolize.

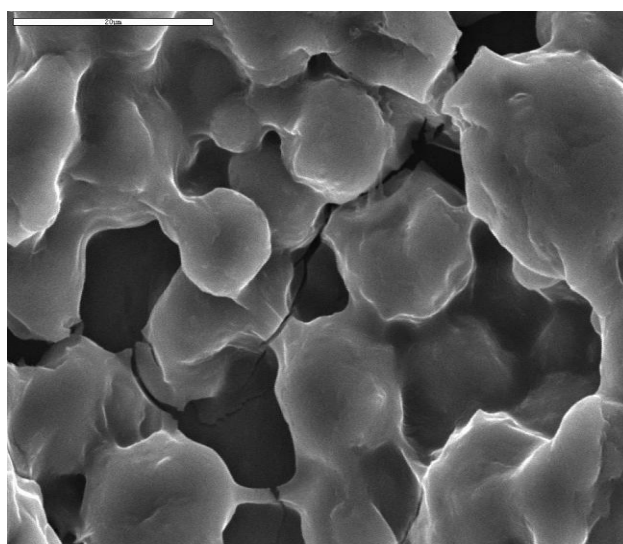
Pri optimalnim vrednostima parametara za predtretman mikrotasima praćena je kinetika dvojno-enzimske hidrolize u toku 5 h. Dobijeni rezultati su upoređeni sa kontrolnim uzorkom (koji nije izlagan dejstvu ni ultrazvuka ni mikrotalasa) i sa uzorkom tretiranim ultrazvukom pri optimalnim parametrima (slika 5.25.), i prikazani su na slici 5.31.



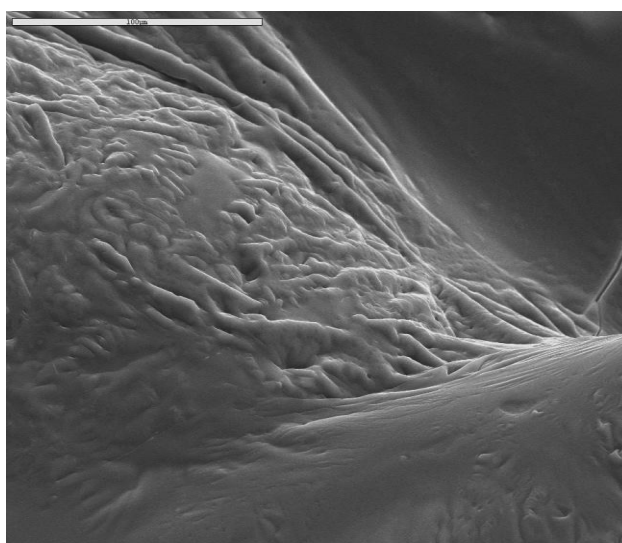
Slika 5.31. Uticaj primene predtretmana ultrazvukom i mikrotalasima pri optimalnim vrednostima parametara na kinetiku dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna. Uslovi procesa: predtretman ultrazvukom –  $t=60$  °C,  $\tau=2,5+2,5$  min,  $v=40$  kHz, predtretman mikrotalasima – snaga 80 W na 96 °C,  $\tau=2,5+2,5$  min, hidromodul 1:3, parametri likvefakcije i saharifikacije kao na slici 5.29.

Na slici 5.31. se može videti da je predtretman mikrotalasima pokazao bolje rezultate u smislu viših koncentracija glukoze koje se postižu tokom enzimske hidrolize, u odnosu na predtretman ultrazvukom. Već nakon 1 h enzimske hidrolize, primenom predtretmana mikrotalasima i ultrazvukom postižu se visoke koncentracije glukoze od 145,09 g/l i 120,02 g/l, respektivno.

Kako bi se ispitaio uticaj dejstva mikrotalasa na strukturu zrna skroba kukuruznog brašna i na efekte dvojno-enzimske hidrolize, na slici 5.32. su prikazane SEM slike: a) uzorka tretiranog mikrotalasisima snage od 80 W 2,5 min pre dodatka enzima Termamyl SC (uvećanje 2000×), b) uzorka tretiranog mikrotalasisima snage od 80 W nakon likvefakcije (uvećanje 500×) i c) uzorka tretiranog mikrotalasisima snage od 80 W nakon saharifikacije (uvećanje 500×). Radni napon je iznosio 20 kV. Ove SEM slike su upoređene sa slikama 5.26. a), b) i c) na kojima su prikazani: suspenzija kukuruznog brašna i vode pre početka hidrolize i bez dejstva mikrotalasa, kontrolni uzorak (bez dejstva mikrotalasa) nakon likvefakcije i kontrolni uzorak nakon saharifikacije, respektivno.

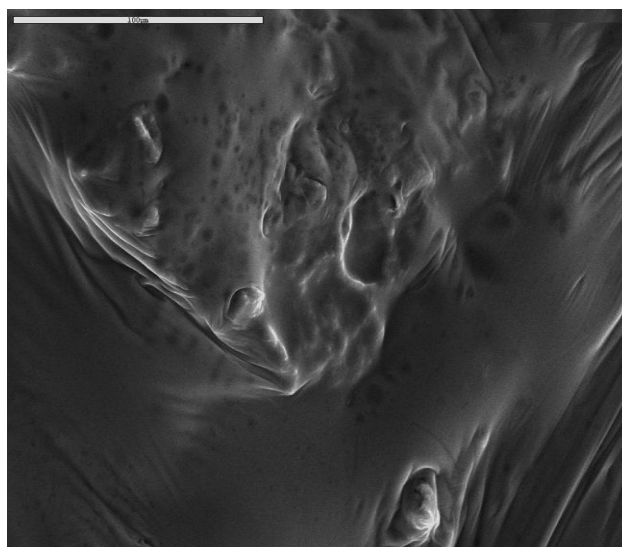


(a)



(b)





(c)

Slika 5.32. SEM slike kukuruzne suspenzije: a) uzorak tretiran mikrotalasima 2,5 min pre dodatka enzima Termamyl SC, b) uzorak tretiran mikrotalasima nakon likvefakcije i c) uzorak tretiran mikrotalasima nakon saharifikacije. Predtretman mikrotalasima – snaga 80 W na 96 °C,  $\tau=2,5+2,5$  min. Dvojno-enzimska hidroliza je vršena pri optimalnim uslovima kao što je prikazano na slici 5.29.

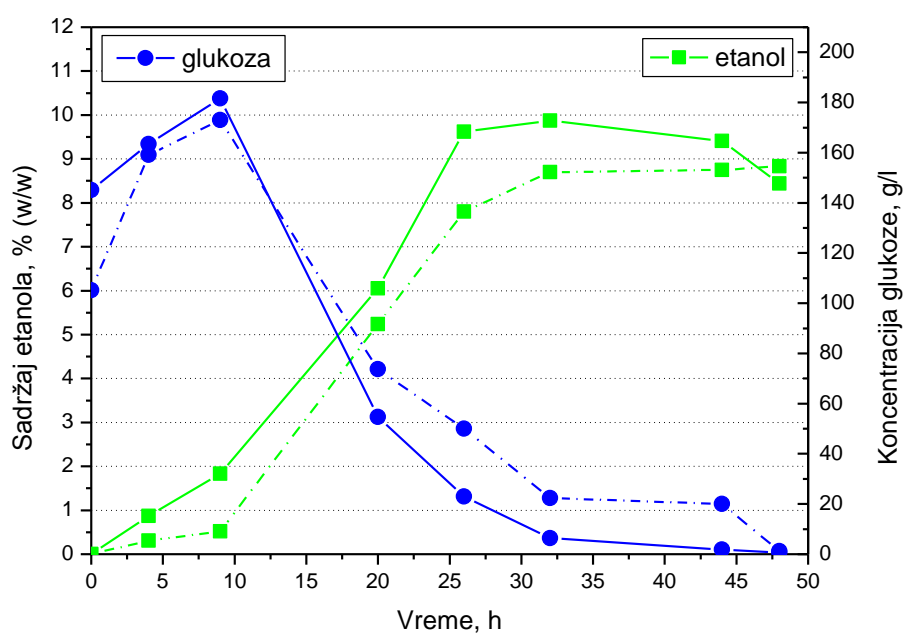
Poređenjem slika 5.26. a) i 5.32 a) može se videti da su mikrotalasi značajno uticali na razgradnju i razaranje strukture granula skroba, što pogoduje boljem otpuštanju skroba koji postaje dostupan za dalju hidrolizu, pa samim tim dolazi i do povećanja prinosa glukoze tokom dvojno-enzimske hidrolize. U skladu sa tim su i rezultati prikazani na slici 5.31. gde se može videti da se u uzorku tretiranom mikrotalasima već posle 1 h enzimske hidrolize postiže koncentracija glukoze za 34% veća nego u kontrolnom uzorku. Poređenjem slika 5.26. b) i 5.32 b) uočava se da je faza utečnjavanja ranije nastupila kod uzorka tretiranog mikrotalasima (s obzirom da je razgradnja strukture skroba započela i pre dodatka enzima Termamyl SC). Potpunija hidroliza skroba se postiže i nakon saharifikacije u uzorku tretiranom mikrotalasima (u odnosu na kontrolni uzorak), kao što je prikazano na slikama 5.26. c) i 5.32 c).

Palav i Seetharaman smatraju da mikrotalasi izazivaju vibraciona kretanja molekula vode prisutnih u okolini kristalne strukture skroba i da se kao posledica tog dejstva razara struktura zrna i pre dostizanja temperature želatinizacije. Oni su pokazali da pri visokim

temperaturama na kojima se izvodi predtretman mikrotalasima izostaje faza bubrenja i odmah nastupa razaranje granula skroba [105, 106].

### 5.2.3.7.3. Uticaj dejstva mikrotalasa kao predtretmana na kinetiku SSF procesa pri optimalnom vremenu i snazi dejstva mikrotalasa

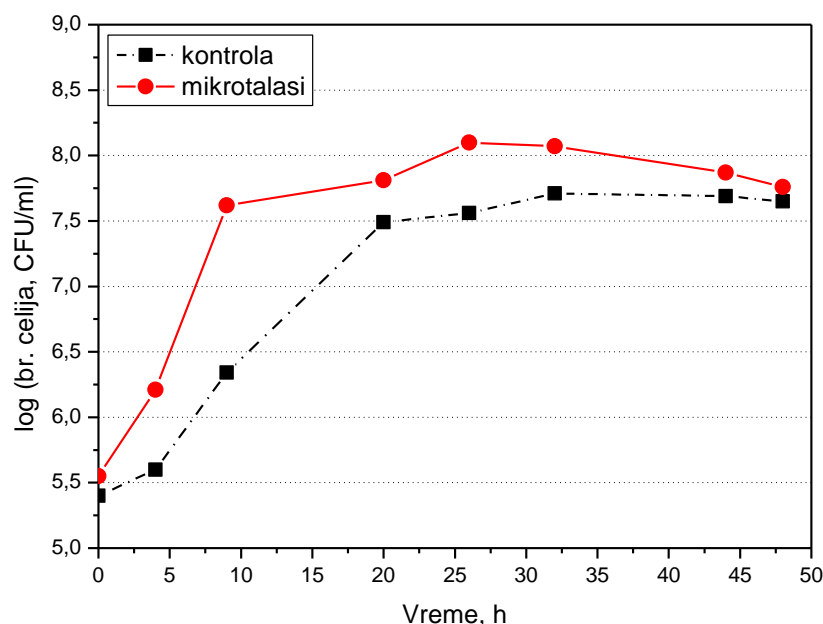
U ovom eksperimentu ispitivana je proizvodnja etanola tokom SSF procesa (bez dodatka aktivatora) uz predtretman uzorka mikrotalasima. Predtretman mikrotalasima izvođen je pri optimalnim parametrima: vreme od 2,5 pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC, snaga 80 W pri temperaturi od 96 °C. U prethodnim eksperimentima (odeljak 5.2.3.5.) SSF proces bez dodatka aktivatora je izbaran kao ekonomski najpovoljniji i najefikasniji u proizvodnji etanola iz kukuruznog brašna pomoću slobodnih ćelija kvasca. SSF proces je vođen pri optimalnim parametrima određenim u prethodnim eksperimentima (odeljak 5.2.3.4.). Sadržaj etanola, koncentracija glukoze i broj ćelija kvasca određivani su nakon 4, 8, 20, 26, 32, 44 i 48 h SSF procesa. Proizvodnja etanola, potrošnja glukoze i promena broja ćelija kvasca u toku 48 h SSF procesa bez dodatka aktivatora i uz predtretman mikrotalasima upoređeni su kontrolnim uzorkom (bez dejstva mikrotalasa), i prikazani su na slikama 5.33. i 5.34.



Slika 5.33. Kinetika proizvodnje etanola i potrošnje glukoze tokom SSF procesa kukuruznog brašna bez dodatka aktivatora pri optimalnim parametrima predtretmana mikrotalasima. Uslovi procesa: predtretman mikrotalasima – snaga 80 W na 96 °C,  $\tau=2,5+2,5$  min; likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85$  °C, pH=6,  $\tau=1$  h, c (Termamyl SC)=0,02% (v/w), brz. mešanja  $v=150$  rpm; SSF proces -  $t=30$  °C pH=5,  $\tau=48$  h, brz. mešanja  $v=100$  rpm, c (SAN Extra L)=0,12% (v/w), količina inokuluma 2% (v/v). Puna linija – uzorak tretiran mikrotalasima, isprekidana linija – kontrolni uzorak (bez dejstva mikrotalasa).

Na slici 5.33. se može videti da su više vrednosti sadržaja etanola tokom 48 h SSF procesa postignute kod uzorka tretiranog mikrotalasima u odnosu na kontrolu. Ovo se može objasniti time što je predtretman mikrotalasima uticao na bržu razgradnju granula skroba (slika 5.32), pa je i početna koncentracija glukoze u tom slučaju bila viša (145 g/l) nego u kontrolnom uzorku. Maksimalan sadržaj etanola postignut je nakon 32 h i iznosio je 9,87% (w/w), što predstavlja uvećanje sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak od 13,45%. Međutim, kod uzorka tretiranog mikrotalasima, nakon 32 h SSF procesa dolazi do opadanja sadržaja etanola usled pojave inhibicije kvasca visokim sadržajem etanola, što je u skladu i sa opadanjem broja ćelija kvasca kao što je prikazano na slici 5.34.

Takođe, na slici 5.33. je zapaženo povećanje koncentracija glukoze na početku SSF procesa (u prvih 8 h) kod uzoraka i sa i bez predtretmana mikrotalasima, ukazujući na to da je brzina hidrolize skroba bila veća od brzine potrošnje glukoze od strane ćelija kvasca. Ova promena koncentracije glukoze je u skladu sa niskim sadržajem etanola na početku SSF procesa. Nakon 8 h procesa vrednosti koncentracije glukoze su opadale tokom SSF procesa. Ovakav trend promene koncentracije glukoze tokom SSF procesa zabeležen je i od strane drugih autora [62, 64, 186]. Kod uzorka tretiranog mikrotalasima, veća je potrošnja glukoze tokom SSF procesa u odnosu na kontrolni uzorak, a nakon 48 h postignuta je niža koncentracija glukoze u odnosu na kontrolni uzorak i iznosila je 0,67 g/l (što odgovara potrošnji glukoze tokom SSF procesa od 99,54%).



Slika 5.34. Promena broja ćelija kvasca u toku SSF procesa kukuruznog brašna bez dodatka aktivatora pri optimalnim parametrima predtretmana mikrotalasisima. Uslovi procesa su kao na slici 5.33. Puna linija – uzorak tretiran mikrotalasisima, isprekidana linija – kontrolni uzorak (bez dejstva mikrotalasa).

Na slici 5.34. se može videti da se kod uzorka tretiranog mikrotalasisima postiže veći broj ćelija tokom SSF procesa u poređenju sa kontrolom, ali i ranije započinje faza odumiranja ćelija kvasca (nakon 26 h) usled inhibicije kvasca proizvodom, odnosno visokom koncentracijom etanola. Faza odumiranja ćelija kod kontrolnog uzorka počinje tek nakon 44 h SSF procesa. Maksimalan broj ćelija od  $1,26 \cdot 10^8$  CFU/ml u uzorku tretiranom mikrotalasisima postignut je nakon 26 h SSF procesa.

Na osnovu slika 5.33. i 5.34. može se videti da se vreme SSF procesa uz predtretman mikrotalasisima može skratiti na 32 h, kao što je to slučaj kod SSF procesa kontrolnog uzorka (odjeljak 5.2.3.4.1.) i uzorka tretiranog ultrazvukom (odjeljak 5.2.3.6.3.). U tabeli 5.22. prikazane su vrednosti procesnih parametara dobijenih prilikom izvođenja SSF procesa sa i bez predtretmana mikrotalasisima nakon 32 h.

Tabela 5.22. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 32 h SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez predtretmana mikrotalasima

<b>Parametar</b>	<b>Kontrola (bez dejstva mikrotalasa)</b>	<b>SSF proces uz predtretman mikrotalasima</b>
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	8,70	9,87
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,45	0,51
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	80,04	90,80
<b>Vol. produktivnost <math>P</math>, g/l·h</b>	2,72	3,08
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	78,75	99,54

Uslovi procesa su kao na slici 5.33.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.22. može se videti da se SSF proces uz predtretman mikrotalasima pokazao kao superiorniji u odnosu na kontrolni uzorak u smislu postizanja viših vrednosti svih procesnih parametara, uštede energije i povećanja energetske efikasnosti procesa. Primenom predtretmana mikrotalasima povećan je maksimalan sadržaj etanola postignut nakon 32 h SSF procesa (13,45% u odnosu na kontrolni uzorak), pa se time povećava vrednost i ostalih procesnih parametara. U slučaju primene predtretmana ultrazvukom povećanje sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak nakon 32 h SSF procesa je bilo manje i iznosilo je 9,31% (tabela 5.20.). Stoga, primena predtretmana mikrotalasima doprinosi efikasnijoj dvojno-enzimskoj hidrolizi u poređenju sa predtretmanom ultrazvukom (slika 5.31.), kao i većem porastu sadržaja etanola i drugih procesnih parametara u odnosu na kontrolni uzorak tokom SSF procesa (slike 5.27. i 5.33., tabele 5.20. i 5.22.).

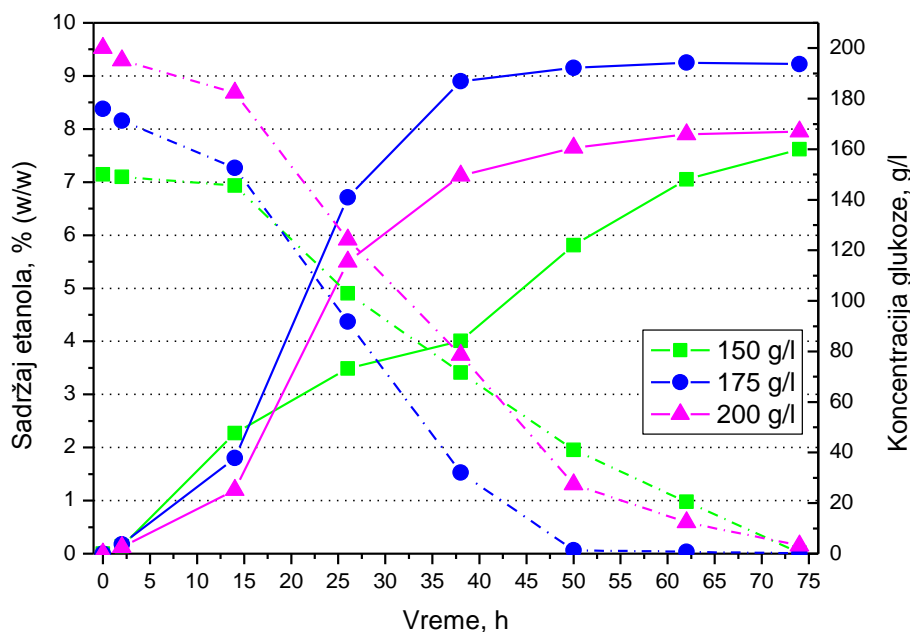
Zhu i saradnici [62] su ispitivali SSF proces pirinčane slame sa i bez primene predtretmana mikrotalasima. Takođe su utvrdili da se više vrednosti sadržaja i prinosa etanola postižu ukoliko je uzorak tretiran mikrotalasima, s obzirom da je tada hidrolizat sa višim sadržajem fermentabilnih šećera pogodniji za izvođenje fermentacije. Pod optimalnim uslovima izvođenja SSF procesa sa dejstvom mikrotalasa postigli su maksimalne vrednosti sadržaja i prinosa etanola od 25,8 g/l i 57,5%, respektivno, koje su znatno niže nego u ovom radu jer je u pitanju lignocelulozna sirovina.

Iako je primena predtretmana mikrotalasima uticala na povećanje produktivnosti etanola tokom SSF procesa, neophodno je prilikom procene ukupnih troškova proizvodnje uzeti u obzir i visoku potrošnju energije tokom mikrotalasnog zagrevanja.

#### **5.2.4. Alkoholna fermentacija sa imobilisanim ćelijama kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus***

##### **5.2.4.1. Uticaj početne koncentracije glukoze na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri konstantnoj količini inokuluma imobilisanog kvasca**

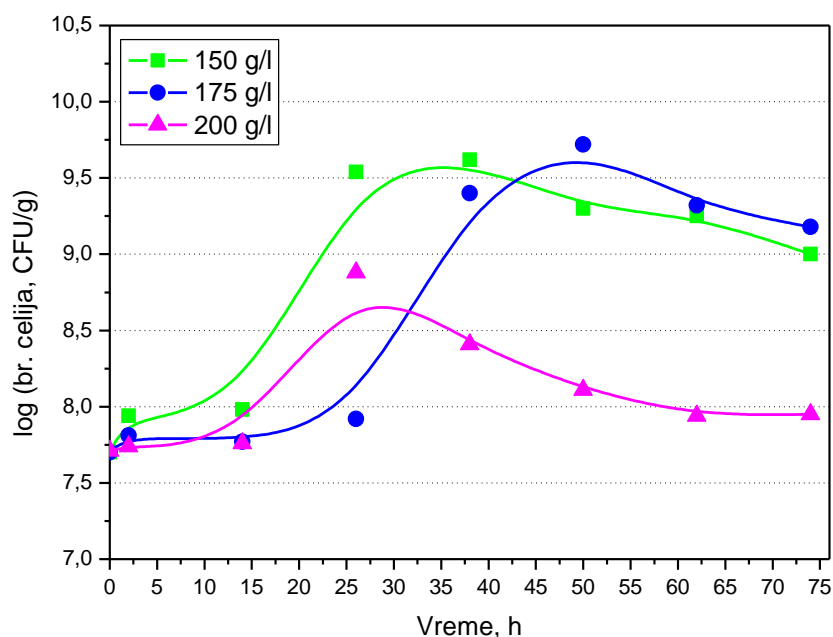
Ovaj set eksperimenata je vođen u cilju određivanja optimalne početne koncentracije glukoze za fermentaciju sa imobilisanim ćelijama kvasca, s obzirom da je početna koncentracija glukoze jedan od bitnih faktora koji utiču na efikasnost alkoholne fermentacije. Izvršeno je ispitivanje promene sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija tokom fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri različitim početnim koncentracijama glukoze: 150, 175 i 200 g/l. Fermentacija je praćena tokom 74 h, a uzorci su analizirani nakon 2, 14, 26, 38, 50, 62 i 74 h. Količina inokuluma iznosila je 2% (w/v), što odgovara početnom broju ćelija kvasca od  $\sim 5 \cdot 10^7$  CFU/g čestica. Rezultati ispitivanja prikazani su na slikama 5.35. i 5.36.



Slika 5.35. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze u toku alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pomoću imobilisanog kvasca pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Količina inokuluma je 2% (w/v). Uslovi procesa: hidromodul 1:3, likvefakcija -  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w), brzina mešanja  $v=150\text{ rpm}$ ; saharifikacija -  $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=4\text{ h}$ ,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w); fermentacija -  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=74\text{ h}$ ,  $v=100\text{ rpm}$ . Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.

Kao što je prikazano na slici 5.35., sadržaj etanola je postepeno rastao tokom fermentacije pri početnim koncentracijama glukoze od 150 i 175 g/l. Najviše vrednosti sadržaja etanola tokom 74 h fermentacije postignute su pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l. Međutim, pri početnoj koncentraciji glukoze od 200 g/l, postignute su niže vrednosti sadržaja etanola zbog pojave inhibicije kvasca supstratom i proizvodom. Na kraju fermentacije, nakon 74 h, maksimalan sadržaj etanola je dostignut pri početnoj koncentraciji od 175 g/l i iznosio je 9,22% (w/w). Takođe, na slici 5.35. se može videti da se najniže vrednosti glukoze nakon 14 h fermentacije postižu ukoliko je početna koncentracija glukoze 175 g/l, što je u skladu sa prikazanim rezultatima o promeni sadržaja etanola. U ovom slučaju, fermentacija je skoro potpuno završena nakon 50 h fermentacije kada je koncentracija glukoze iznosila 1,36 g/l, što odgovara potrošnji glukoze od 99,23%.

Wendhausen i saradnici [210] su objavili da je prinos etanola tokom šaržne fermentacije šećerne trske pomoću imobilisanog kvasca *S. cerevisiae* strogo zavisio od početne koncentracije glukoze. Međutim, u njihovom radu inhibicija supstratom je zapažena pri veoma visokim početnim koncentracijama glukoze (iznad 30%). Roukas [211] je istraživao proizvodnju etanola dolivnim postupkom iz melase šećerne repe pomoću kvasca *S. cerevisiae* imobilisanog u Ca-alginatu. Najvišu vrednost sadržaja etanola postigao je pri početnoj koncentraciji glukoze od 250 g/l. Ova početna koncentracija glukoze je mnogo viša od optimalne početne koncentracije u ovom radu, jer je korišćen dolivni postupak proizvodnje kao i različita sirovina. Roukas [211] i Ozmihci i Kargi [192] su predložili korišćenje dolivnog postupka proizvodnje etanola kao način da se prevaziđe inhibicija supstratom koja se javlja pri visokim koncentracijama šećera u sistemu i sa slobodnim i imobilisanim ćelijama kvasca.



Slika 5.36. Promena broja ćelija imobilisanog kvasca u toku alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Količina inokuluma je 2% (w/v). Uslovi procesa kao na slici 5.35.

Kao što je prikazano na slici 5.36., tokom fermentacije najmanji broj ćelija kvasca je zapažen kada je početna koncentracija glukoze iznosila 200 g/l. Do ovoga je došlo usled inhibicije rasta kvasca supstratom, a na kraju fermentacije i proizvodom. Takođe, pri ovoj



početnoj koncentraciji glukoze ćelije kvasca najranije ulaze u fazu odumiranja. Pri početnoj koncentraciji glukoze od 150 g/l imobilisane ćelije kvasca brže ulaze u stacionarnu fazu rasta (s obzirom da je glukoza iz fermentacione podloge mnogo brže iskorišćena od strane kvasaca pri nižoj početnoj koncentraciji glukoze) nego pri višoj koncentraciji od 175 g/l. Na kraju fermentacije najveći broj ćelija od  $1,51 \cdot 10^9$  CFU/g postiže se pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l, što predstavlja promenu broja ćelija u odnosu na početni broj za 1,48 logaritamskih jedinica.

Troškovi proizvodnje etanola mogu se značajno smanjiti postizanjem što većeg sadržaja etanola tokom fermentacije kako bi se smanjili troškovi destilacije etanola, kao i smanjenjem vremena trajanja alkoholne fermentacije. Na slici 5.35. se može videti da su maksimalne vrednosti etanola postignute pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l. Pri ovoj početnoj koncentraciji glukoze izvršena je procena osnovnih procesnih parametara nakon 26, 38 i 74 h fermentacije radi određivanja optimalne dužine trajanja fermentacije (tabela 5.23). Veoma visoke vrednosti sadržaja etanola od 8,90% (w/w), prinosa etanola od 0,46 g/g, procenta od teorijskog sadržaja etanola od 81,88%, volumetrijske produktivnosti od 2,34 g/l·h i potrošnje glukoze od 94,14% postignute su nakon 38 h fermentacije pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l. Daljim produžavanjem vremena fermentacije ne dolazi do značajnijeg porasta vrednosti procesnih parametara, a dolazi i do smanjenja volumetrijske produktivnosti. Na osnovu prikazanih rezultata (slika 5.35., tabela 5.23.) predlaže se smanjenje vremena fermentacije na 38 h i izbor početne koncentracija glukoze od 175 g/l kao optimalne vrednosti.

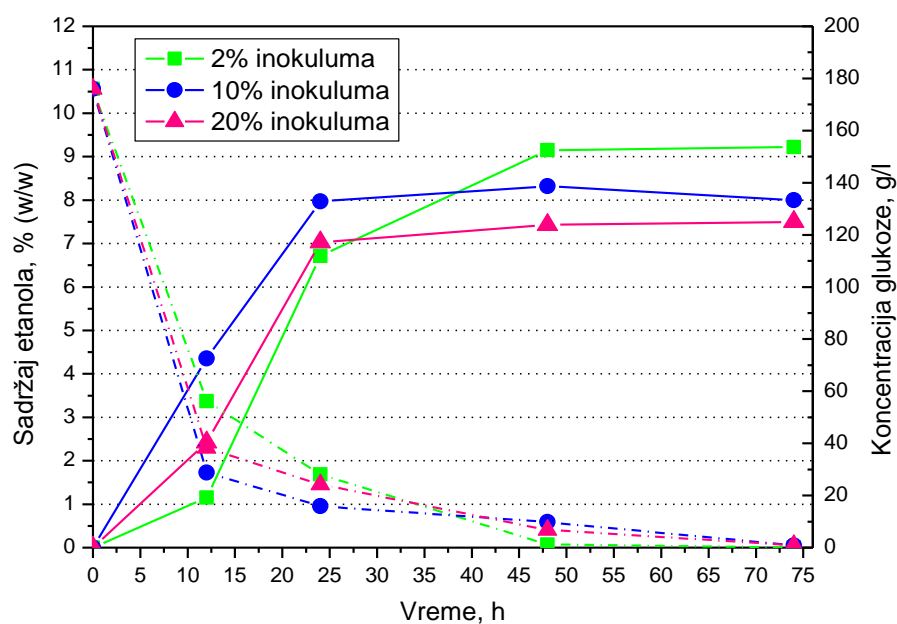
#### 5.2.4.2. Uticaj količine inokuluma imobilisanog kvasca na tok alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pri optimalnoj početnoj koncentraciji glukoze

Kako bi se ispitao uticaj početne količine inokuluma na tok alkoholne fermentacije praćena je promena sadržaja etanola, koncentracije glukoze i broja ćelija kvasca tokom 74 h fermentacije sa 10 i 20% (w/v) inokuluma pri optimalnoj početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l. Rezultati ispitivanja su upoređeni sa rezultatima dobijenim tokom fermentacije sa 2% (w/v) inokuluma i prikazani su na slikama 5.37. i 5.38. U tabeli 5.23. prikazani su značajni procesni parametri postignuti tokom fermentacije sa različitim količinama inokuluma imobilisanog kvasca i konstantnoj početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l.

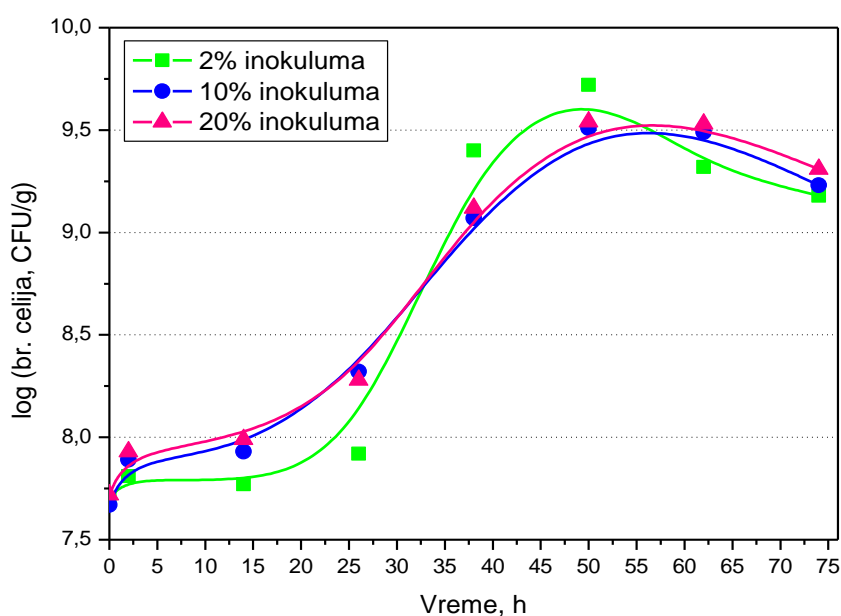
Tabela 5.23. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih tokom alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa različitim početnim količinama inokuluma imobilisanog kvasca

Vreme, h	Početna količina inokuluma, % (w/v)	Sadržaj etanola, % (w/w)	Prinos etanola $Y_{P/S}$ , g/g	Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %	Vol. produktivnost P, g/l·h	Potrošnja glukoze, %
26	2	6,71	0,35	61,73	2,58	84,94
	10	8,01	0,42	73,69	3,08	92,16
	20	7,15	0,37	65,78	2,75	85,10
38	2	8,90	0,46	81,88	2,34	94,14
	10	8,20	0,43	75,44	2,16	91,00
	20	7,25	0,38	66,70	1,91	94,91
74	2	9,22	0,48	84,82	1,25	99,93
	10	8,00	0,42	73,60	1,08	99,52
	20	7,50	0,39	69,00	1,01	99,45

Uslovi procesa kao na slici 5.35. Početna koncentracija glukoze je 175 g/l.



Slika 5.37. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze u toku alkoholne fermentacije sa različitim početnim količinama inokuluma imobilisanog kvasca. Početna koncentracija glukoze je 175 g/l. Uslovi procesa su kao na slici 5.35. Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.



Slika 5.38. Promena broja ćelija imobilisanog kvasca u toku alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa različitim količinama inokuluma. Početna koncentracija glukoze je 175 g/l. Uslovi procesa kao na slici 5.35.

Maksimalan krajnji sadržaj etanola (slika 5.37., tabela 5.23.), kao i maksimalan prinos etanola, procenat od teorijskog sadržaja etanola i volumetrijska produktivnost, postignuti su pri početnoj količini inokuluma od 2% (w/v). Nakon 26 h fermentacije vrednosti ovih procesnih parametara pri većim količinama inokuluma od 10 i 20% (w/v) bile su mnogo niže od vrednosti parametara postignutih pri količini inokuluma od 2% (w/v). Ovo pokazuje da nije potrebno koristiti veće količine inokuluma jer to nije doprinelo povećanju sadržaja etanola a time i drugih procesnih parametara. Tokom fermentacije, pri svakoj količini inokuluma, dolazi do opadanja koncentracije glukoze što je u skladu sa porastom sadržaja etanola. Na kraju fermentacije najveća potrošnja glukoze od 99,93% postignuta je pri količini inokuluma od 2% (w/v).

Na slici 5.38. može se uočiti da pri količini inokuluma od 2% (w/v) ćelije brže ulaze u stacionarnu fazu rasta, a nakon 50 h fermentacije brže i odumiru. Trend promene broja ćelija tokom fermentacije sa 10 i 20% (w/v) inokuluma je veoma sličan. Maksimalan broj ćelija je postignut nakon 50 h pri količini inokuluma od 2% (w/v) i iznosio je  $5,25 \cdot 10^9$  CFU/g, što predstavlja promenu broja ćelija u odnosu na početni broj za 2,02 logaritamske jedinice.

Razlog zbog čega povećanje količine inokuluma iznad određene vrednosti nije rezultovao u povećanju prinosa etanola je verovatno činjenica da je pri višim koncentracijama inokuluma više supstrata utrošeno za rast ćelija kvasca. Optimalna količina inokuluma i za slobodne i za imobilisane ćelija kvasca je iznosila 2% (w/v), što ukazuje na to da ne postoje ograničenja difuzije supstrata kod imobilisanih ćelija i da je primenjeni metod imobilizacije ćelija odgovarajući.

#### ***5.2.4.3. Poređenje proizvodnje bioetanola pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca tokom SHF procesa (odvojene saharifikacije i fermentacije)***

Tokom fermentacije sa slobodnim ćelijama kvasca, maksimalne vrednosti sadržaja etanola, prinosa etanola, procenta od teorijskog sadržaja etanola, volumetrijske produktivnosti i potrošnje glukoze postignute su pri početnoj koncentraciji glukoze od 150 g/l (slika 5.10., tabela 5.12.). Pri ovoj koncentraciji supstrata slobodne ćelija kvasca predstavljaju produktivniji sistem od imobilisanih ćelija. S druge strane, kod fermentacije

sa imobilisanim kvascem maksimalne vrednosti svih značajnih procesnih parametara postignute su pri višoj početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l (slika 5.35., tabela 5.23).

Singh i saradnici [145] su u svom radu zaključili da je koncentracija proizvedenog etanola relativno slična kod šaržne fermentacije sa slobodnim i imobilisanim ćelijama kvasca u Ca-alginatu. Međutim, u ovom radu imobilisane ćelije su pokazale povećanu tolerantnost prema višim koncentracijama supstrata i proizvoda u odnosu na slobodne ćelije kvasca. Tokom fermentacije sa imobilisanim kvascem, do inhibicije supstratom je došlo pri početnoj koncentraciji glukoze od 200 g/l (slika 5.35.), dok su slobodne ćelije kvasca inhibirane pri nižoj početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l (slika 5.10.). Smatra se da su ćelije imobilisane u Ca-alginatu tolerantnije na etanol s obzirom da matriks ima zaštitnu ulogu pri toksičnom delovanju visokih koncentracija etanola, kao što su objavili Ciesarová i saradnici [212] and Verbelen i saradnici [213].

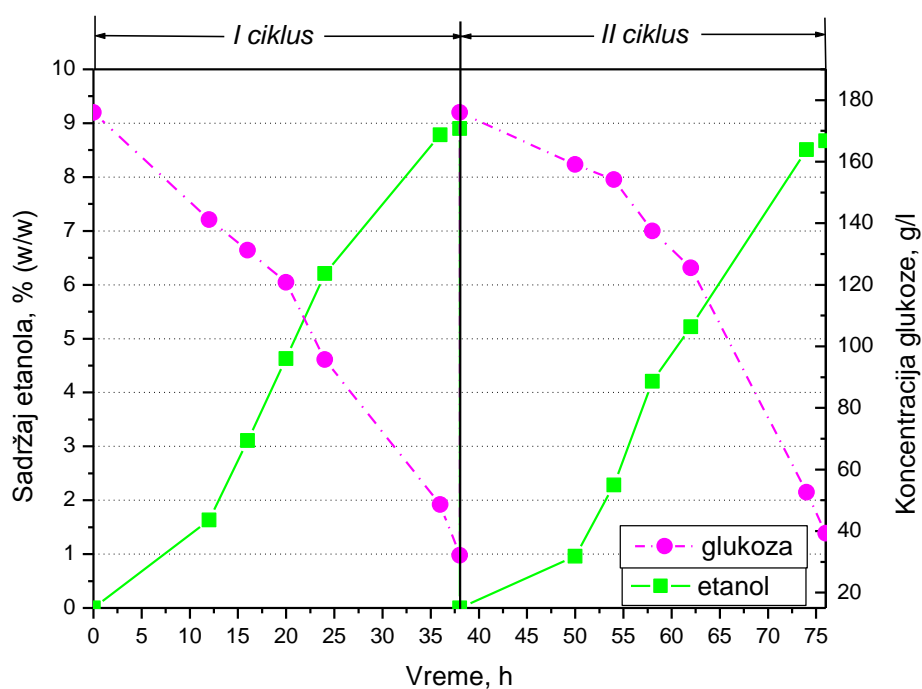
Wendhausen i saradnici [210] su ispitivali šaržnu fermentaciju sirupa šećerne trske pomoću imobilisanih i slobodnih ćelija kvasca *S. cerevisiae* pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Oni su objavili da je pri početnoj koncentraciji glukoze od 10% postignut prinos etanola od 87% od teorijskog prinosa u imobilisanom sistemu, i viši prinos etanola od 90% u sistemu sa slobodnim ćelijama. Kada je početna koncentracija glukoze povećana na 20%, viši prinos etanola (92%) je postignut sa imobilisanim nego sa slobodnim kvascem (88,6%). U ovoj disertaciji, pri početnoj koncentraciji glukoze od 150 g/l, prinos etanola je bio dva puta veći u sistemu sa slobodnim ćelijama nakon 38 h fermentacije, ali pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l sistem sa imobilisanim kvascem se pokazao kao superiorniji (slike 5.10. i 5.35., tabele 5.12. i 5.23.).

Poređenjem značajnih procesnih parametara postignutih tokom fermentacije sa slobodnim i imobilisanim kvascem (tabele 5.12. i 5.23.), viši sadržaj etanola, volumetrijska produktivnost i procenat od teorijskog sadržaja etanola su postignuti u imobilisanom sistemu pod optimalnim procesnim parametrima (početna količina inokuluma od 2% za oba sistema; početne koncentracije glukoze od 150 i 175 g/l za slobodni i imobilisani kvasac, respektivno). Porast vrednosti procesnih parametara nije toliko velik u šaržnom sistemu, ali može biti od velikog značaja u kontinualnom fermentacionom sistemu sa imobilisanim ćelijama. Prednost imobilisanog sistema može biti potvrđena detaljnom ekonomskom analizom kompletnog procesa uključujući i fazu imobilizacije ćelija. Prema

tome, primena imobilisanog sistema u kontinualnom postupku proizvodnje etanola je deo budućih istraživanja.

#### 5.2.4.4. Kinetika alkoholne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa recirkulacijom imobilisanih ćelija kvasca

U ovom eksperimentu su izvođena dva uzastopna ciklusa šaržne fermentacije pri istim procesnim uslovima. Svaki ciklus je izvođen pri optimalnim parametrima fermentacije koji su određeni u prethodnim eksperimentima: vreme trajanja od 38 h, početna količina inokuluma od 2% (w/v) i početna koncentracija glukoze od 175 g/l. U svakoj narednoj šarži vršena je korekcija početnog broja ćelija, pa je početan broj ćelija kvasca na početku svakog ciklusa bio isti ( $\sim 5 \cdot 10^7$  CFU/g čestica). Rezultati ispitivanja su prikazani na slici 5.39. i u tabeli 5.24.



Slika 5.39. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze u toku prvog i drugog ciklusa šaržne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pomoću imobilisanog kvasca. Uslovi procesa: parametri likvefakcije i saharifikacije kao na slici 5.35.; fermentacija -  $t=30$  °C, pH=5,  $\tau=38$  h,  $v=100$  rpm, početna koncentracija glukoze 175 g/l, količina inokuluma 2% (w/v). Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.

Tabela 5.24. Vrednosti značajnih procesnih parametara i broja ćelija u prvom i drugom ciklusu šaržne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna pomoću imobilisanog kvasca

Parametar	Fermentacioni ciklus	
	I ciklus, 38 h	II ciklus, 38 h
Sadržaj etanola, % (w/w)	8,90	8,67
Prinos etanola $Y_{P/S}$ , g/g	0,46	0,45
Procenat od teor. sadrž. etanola, %	81,88	79,76
Vol. produktivnost P, g/l·h	2,34	2,28
Potrošnja glukoze, %	81,76	77,70
Broj ćelija, CFU/g	$2,50 \cdot 10^9$	$3,35 \cdot 10^{10}$

Uslovi procesa kao na slici 5.39.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 5.39. i u tabeli 5.24. može se videti da su postignute vrednosti sadržaja etanola u toku prvog ciklusa neznatno više nego u drugom ciklusu. Između 12 i 36 h fermentacije uočava se intezivna produkcija etanola u oba ciklusa. U skladu sa promenom sadržaja etanola tokom fermentacije, brzina iskorišćenja glukoze u prvom ciklusu neznatno je veća nego u drugom ciklusu. U tabeli 5.24. se može videti da je broj ćelija kvasca unutar čestica Ca-alginata intezivno rastao od prvog do drugog fermentacionog ciklusa. Takođe, na kraju svakog ciklusa sadržaj etanola i ostali procesni parametri se neznatno razlikuju, što pokazuje da su ćelije kvasca imobilisane u Ca-alginatu očuvale svoju aktivnost u proizvodnji etanola tokom 3 dana. Nakon drugog ciklusa dobijeni sadržaj etanola od 8,67% (w/w) je manji od sadržaja etanola na kraju prvog ciklusa od 8,90% (w/w) za samo 2,58% (tabela 5.24.).

U drugom ciklusu šaržne fermentacije sa recirkulisanim ćelijama, nakon 24, 36 i 38 h, primećeno je da dolazi do topljenja alginatnih čestica u izvestnoj meri. Nakon izdvajanja imobilisanih ćelija iz fermentacione komine i njihove pripreme za ponovnu recirkulaciju dolazi do potpunog degradiranja strukture alginatnih čestica, pa je bilo moguće izvesti samo dva ciklusa fermentacije. Do razaranja alginatnih čestica dolazi nakon 3 dana fermentacije, zbog intezivnog rasta broja ćelija unutar Ca-alginata (koji je dostigao vrednost od  $3,35 \cdot 10^{10}$  CFU/g) i izdvajanja gasa  $\text{CO}_2$  tokom fermentacije. Naime, intezivno razmnožavanje ćelija kvasca unutar matriksa izazvalo je nestabilnost Ca-alginata u

uslovima niske pH vrednosti tokom fermentacije. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima istraživanja Bekers-a i saradnika [214] koji su ispitivali šaržnu fermentaciju saharaže pomoću ćelija *Zymomonas mobilis* imobilisanih u Ca-alginatu. Oni su objavili da dolazi do povećanja zapremine alginatnih čestica, a zatim i do njihove degradacije nakon 4-5 dana.

Čestice Ca-alginata sa imobilisanim ćelijama kvasca su imale prilično ujednačen, prosečan prečnik od 0,8 mm (slika 4.2.). Smatra se da su čestice malog prečnika pogodnije za izvođenje fermentacije s obzirom da obezbeđuju bolji prenos mase. Kurosawa i saradnici [215] su u svom radu pokazali da je optimalan prečnik alginatnih čestica sa ćelijama kvasca *S. cerevisiae* 0,5 mm.

Značaj ove metode imobilizacije je u tome da matriks uspešno zadržava ćelije, a ujedno je i dovoljno porozan da obezbedi slobodan prenos supstrata i proizvoda [216]. Alginat je veoma pogodan za ovu metodu imobilizacije (obuhvatanje unutar poroznog matriksa-gela) s obzirom da ima dobre mehaničke osobine, nisku cenu i nije toksičan [217]. Međutim, nedostatak primene Ca-alginata kao imobilizacionog matriksa je taj što fosfati, EDTA i katjoni  $Mg^{2+}$  i  $K^{+}$  mogu razoriti strukturu gela rastvaranjem  $Ca^{2+}$  jona. To dovodi do raskidanja veza između Ca i alginata, odnosno do gubitka mehaničke stabilnosti gela i potpunog razaranja njegove strukture [216]. U ovom radu alginatne čestice (sa koncentracijom alginata od 2% w/w) su pokazale dobru fizičku i hemijsku stabilnost u toku dva ciklusa fermentacije (ukupno 3 dana) i nisu zapažena ograničenja difuzije supstrata i proizvoda. Najafpour i saradnici [7] su takođe objavili da je koncentracija alginata od 2% (w/w) u alginatnim česticama bila odgovarajuća za održavanje aktivnosti čestica u proizvodnji etanola u imobilisanom reaktoru tokom 10 dana. U njihovom radu korišćenjem viših koncentracija alginata (3-6% w/w) dobijene su čestice koje su stabilnije i čvršće ali sa difuzionim ograničenjima. Sree i saradnici [218] su ispitivali šaržnu fermentaciju sa recirkulacijom ćelija osmotoleratnog kvasca *S. cerevisiae* imobilisanog u Ca-alginatu pri početnim koncentracijama glukoze od 150, 200 i 250 g/l i različitim količinama inokuluma (125 i 250 alginatnih čestica, odnosno 0,3125 i 0,625 g ćelija kvasca). Koncentracija alginata je bila 3% (w/w). Pri ovim eksperimentalnim uslovima uspešno je izvedeno 6 ciklusa fermentacije (svaki u trajanju od 48 h), i u svakom narednom ciklusu došlo je povećanja krajnjeg sadržaja etanola. Alginatne čestice su održale svoju stabilnost u toku 12 dana, što je mnogo duže nego u ovom radu, usled drugačije vrste



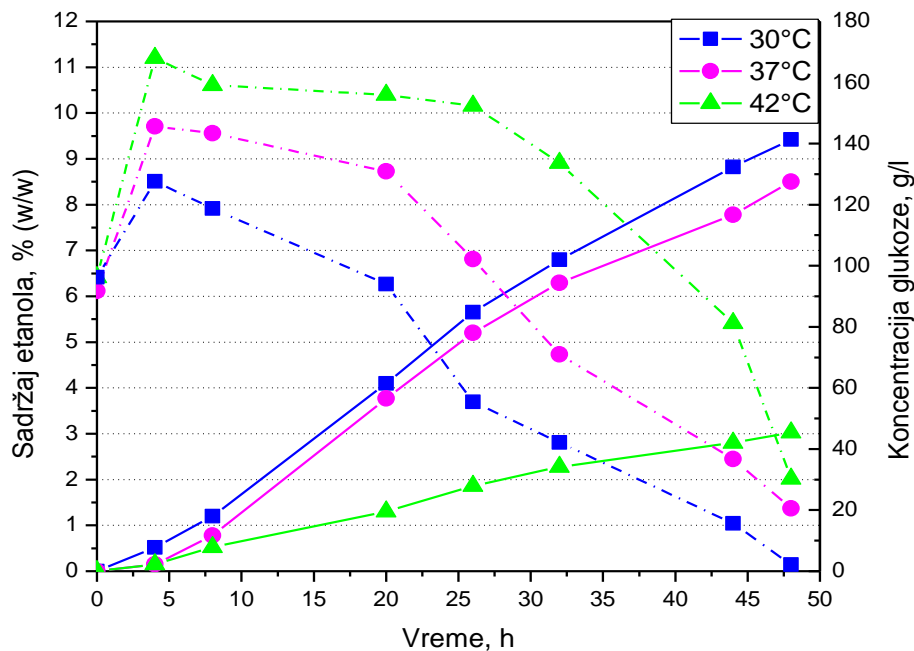
kvasca i više koncentracije alginata u alginatnim česticama koje su bile dovoljno čvrste i stabilne, a i porozne za transport supstrata i proizvoda.

#### ***5.2.4.5. Proizvodnja etanola u postupku simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kukuruznog brašna pomoću imobilisanog kvasca***

U prethodnim eksperimentima koji su izvođeni sa slobodnim ćelijama kvasca, SSF proces se pokazao kao ekonomski povoljniji proces u odnosu na odvojenu saharifikaciju i fermentaciju (SHF) usled značajne uštede energije, skraćenja vremena trajanja, povećanja prinosa etanola i poboljšanja produktivnosti proizvodnje etanola. Stoga, potrebno je ispitati i SSF proces sa imobilisanim ćelijama kvasca (pri različitim radnim temperaturama i pri dodatku aktivatora) i uporediti dobijene rezultate sa SSF procesom sa slobodnim ćelijama kvasca.

##### ***5.2.4.5.1. Uticaj temperature na tok SSF procesa***

Ovaj set eksperimenata vođen je u cilju određivanja optimalne temperature za izvođenje SSF procesa. U tu svrhu ispitivane su tri radne temperature: 30, 37 i 42 °C. Sadržaj etanola, koncentracija glukoze i broj ćelija mereni su nakon 4, 8, 20, 26, 32, 44 i 48 h SSF procesa. Korišćene su optimalne koncentracije enzima Termamyl SC (0,02% v/w) i SAN Extra L (0,12% v/w), kao i optimalna količina inokuluma od 2% (w/v), određeni u prethodnim eksperimentima. Početan broj ćelija kvasca je iznosio  $\sim 5 \cdot 10^7$  CFU/g čestica. Koncentracija glukoze na početku SSF procesa (nakon likvefakcije) iznosila je  $\sim 100$  g/l. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze u toku 48 h SSF procesa kukuruznog brašna sa imobilisanim ćelijama kvasca pri različitim radnim temperaturama prikazana je na slici 5.40.



Slika 5.40. Promena sadržaja etanola i koncentracije glukoze tokom SSF procesa kukuruznog brašna sa imobilisanim ćelijama kvasca i pri različitim temperaturama. Uslovi procesa: likvefakcija - hidromodul 1:3,  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\tau=1\text{ h}$ ,  $c$  (Termamyl SC)=0,02% (v/w), brz. mešanja  $v=150\text{ rpm}$ ; SSF proces -  $\text{pH}=5$ ,  $\tau=48\text{ h}$ , brz. mešanja  $v=100\text{ rpm}$ ,  $c$  (SAN Extra L)=0,12% (v/w), količina inokuluma 2% (w/v), početan br. ćelija  $\sim 5 \cdot 10^7$  CFU/g. Puna linija – sadržaj etanola, isprekidana linija – koncentracija glukoze.

Kao što je prikazano na slici 5.40., sadržaj etanola postepeno raste sve vreme trajanja SSF procesa pri svakoj radnoj temperaturi. Međutim, na temperaturi od  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  postignute su veoma niske vrednosti sadržaja etanola. Ove vrednosti sadržaja etanola su bile više od onih postignutih tokom SSF procesa sa slobodnim ćelijama kvasca pri istoj temperaturi od  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  (slika 5.17.), ali još uvek nezadovoljavajuće. Maksimalan sadržaj etanola od 9,42% (w/w), prinos etanola od 0,49 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 86,66%, volumetrijska produktivnost od 1,96 g/l·h i potrošnja glukoze od 97,72% nakon 48 h SSF procesa postignuti su na temperaturi od  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vrednosti procesnih parametara postignutih na temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  bile su niže nego na temperaturi od  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (slika 5.40., tabela 5.25.)

Na slici 5.40. se može videti da su vrednosti koncentracije glukoze bile najviše na temperaturi od  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a najniže na temperaturi od  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ovi rezultati su u skladu sa promenom sadržaja etanola s obzirom da se glukoza koristi od strane ćelija kvasca kao

izvor ugljenika. Veoma visoka temperatura od 42 °C je imala inhibični efekat na rast kvasca i produkciju etanola. Kao i tokom SSF procesa sa slobodnim ćelijama, i u slučaju imobilisanog kvasca zapažen je porast koncentracije glukoze na početku SSF procesa pri svakoj radnoj temperaturi. To ukazuje da je tada brzina hidrolize bila veća od brzine fermentacije, a produkcija etanola neznatna. Na kraju SSF procesa na 30, 37 i 42 °C koncentracija glukoze je opala do vrednosti 2,19 g/l, 20,55 g/l i 30,32 g/l, respektivno. Veoma niska vrednost krajnje koncentracije glukoze na 30 °C ukazuje na završetak fermentacije s obzirom da je glukoza skoro potpuno utrošena.

U tabeli 5.25. prikazane su vrednosti procesnih parametara dobijenih nakon 48 h SSF procesa na temperaturama od 30 i 37 °C. Veoma niske vrednosti ovih procesnih parametara dobijene tokom SSF procesa na temperaturi od 42 °C nisu prikazane s obzirom da se smatraju zanemarljivim.

Tabela 5.25. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna sa imobilisanim ćelijama kvasca na različitim radnim temperaturama

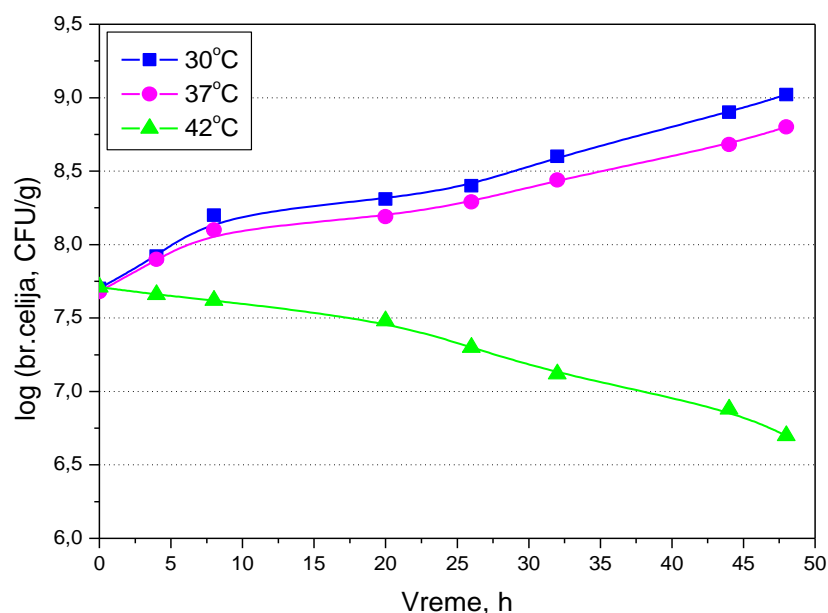
<b>Temperatura, °C</b>	<b>30</b>	<b>37</b>
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	9,42	8,50
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	86,66	78,20
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,49	0,44
<b>Vol. produktivnost P, g/l·h</b>	1,96	1,77
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	97,72	77,61

Uslovi procesa su isti kao na slici 5.40.

Sree et al. [218] su ispitivali šaržnu fermentaciju sa termotolerantnim kvascem *S. cerevisiae* VS<sub>3</sub> imobilisanim u Ca-alginatu. Optimalna radna temperatura je iznosila 30 °C, a na temperaturi od 42 °C postignuti su veoma niski prinosi etanola, slično rezultatima u ovom radu. Nasuprot ovome, Liu i saradnici [219] su objavili da je za šaržnu proizvodnju etanola iz sirka pomoću kvasca *S. cerevisiae* (CICC 1308) imobilisanog u Ca-alginatu, optimalna temperatura nešto viša nego u ovoj disertaciji i iznosi 37 °C. Çaylak and Sukan

[174] su ispitivali šaržnu alkoholnu fermentaciju iz sintetičkog medijuma sa *S. cerevisiae* ali koji je imobilisan u 2% gelu agara. Optimalna temperatura je u njihovom radu je nešto niža i iznosi 28 °C (s obzirom da se kao nosač za imobilizaciju koristi agar umesto Ca-alginata), a postignute vrednosti sadržaja etanola i volumetrijske produktivnosti u toku 96 h fermentacije su niže nego u ovom radu.

Promena broja ćelija imobilisanog kvasca tokom SSF procesa kukuruznog brašna pri različitim temperaturama prikazana je na slici 5.41.



Slika 5.41. Promena broja ćelija imobilisanog kvasca u toku SSF procesa kukuruznog brašna pri različitim temperaturama. Uslovi procesa su isti kao na slici 5.40.

Kao što je prikazano na slici 5.41., na temperaturama 30 i 37 °C nije uočena lag faza, broj ćelija je postepeno rastao tokom svih 48 h SSF procesa, i nije uočeno smanjenje broja ćelija odnosno faza odumiranja. Maksimalni broj ćelija imobilisanog kvasca je postignut na 30 °C i iznosio je  $1,05 \cdot 10^9$  CFU/g čestica. Ovi rezultati odgovaraju činjenici da ne postoji faza opadanja ni u produkciji etanola tokom SSF procesa na 30 i 37 °C (slika 5.40.). Tokom SSF procesa na temperaturi od 42 °C broj ćelija polako opada ukazujući na to visoka temperatura negativno utiče na rast ćelija kao i da je došlo do inhibicije kvasca supstratom. Profil promene broja ćelija imobilisanog kvasca tokom SHF procesa (na 30 °C i pri početnoj koncentraciji glukoze od 176 g/l) prikazan na slici 5.36. je drugačiji nego

tokom SSF procesa pri istim procesnim uslovima (slika 5.41). Naime, u 50 h SHF procesa postignut je maksimalan broj ćelija od  $5,25 \cdot 10^9$  CFU/g nakon čega nastupa faza odumiranja. Faza odumiranja ćelija nije uočena kod SSF procesa. Tokom 48 h SHF i SSF procesa (pri istim procesnim uslovima) došlo je do promene broja ćelija u odnosu na početan broj od 2,02 i 1,32 logaritamskih jedinica, respektivno.

Roukas [211] je ispitivao proizvodnju etanola dolivnim postupkom iz melase šećerne repe pomoću kvasca *S. cerevisiae*, slobodnog i imobilisanog u Ca-alginatu. Maksimalan broj ćelija imobilisanog kvasca od  $2,4 \cdot 10^9$  CFU/g postignut je pri početnoj koncentraciji glukoze od 200 g/l i radnoj temperaturi od 30 °C, što je slično rezultatima u ovom radu.

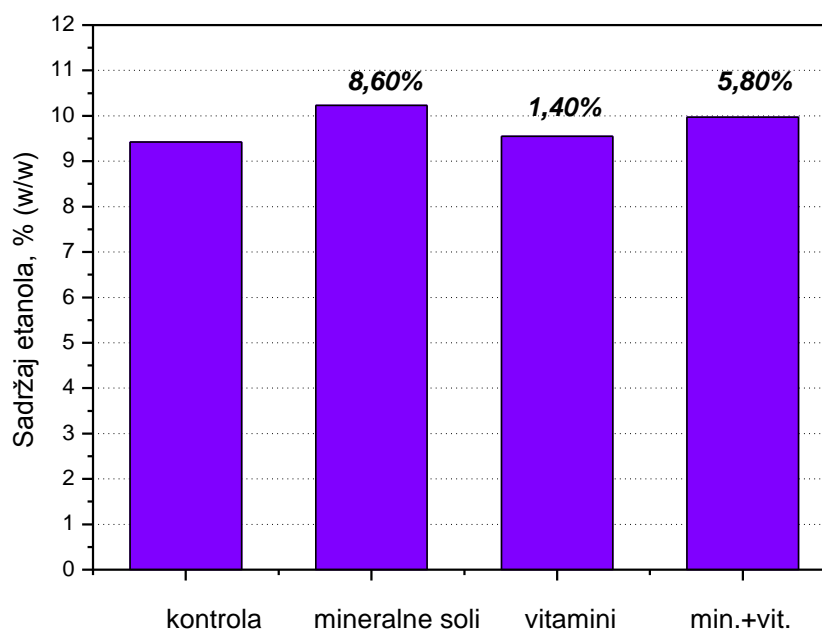
Ukoliko se uporedi promena sadržaja etanola tokom SHF i SSF procesa sa imobilisanim ćelijama kvasca pri istim eksperimentalnim uslovima (slike 5.35. i 5.40., tabele 5.23. i 5.25.) može se videti da sadržaj etanola raste sve vreme trajanja SSF procesa, dok se kod SHF procesa uočava nagli porast sadržaja etanola do 26 h a nakon toga se dobijaju relativno bliske vrednosti sadržaja etanola. Bez obzira na različiti profil produkcije etanola kod SHF i SSF procesa, krajnji sadržaj etanola, nakon 48 h procesa, je veoma sličan za ova dva procesa i iznosi 9,22 i 9,42% (w/w), respektivno. Postepen porast sadržaja etanola tokom SSF procesa je i očekivan s obzirom da se uporedo sa fermentacijom vrši i saharifikacija, pa je i postepeno opadanje koncentracije glukoze, dok se kod SHF procesa uočava nagli pad koncentracije glukoze (slike 5.35. i 5.40.). Slična kinetika SHF i SSF procesa bez dodatka aktivatora je i u slučaju slobodnih ćelija kvasca, što se može videti na slici 5.23.

Takođe, kod SHF procesa (pri optimalnim parametrima procesa) uspešno se može skratiti vreme trajanja procesa na 38 h, dok se SSF proces izvodi 48 h. Ukoliko bi se zbirno posmatralo vreme trajanja dvojno-enzimske hidrolize i SHF procesa, odnosno likvefakcije i SSF procesa, to bi iznosilo 43 i 49 h, respektivno.

#### 5.2.4.5.2. Uticaj dodatka različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina) na tok SSF procesa

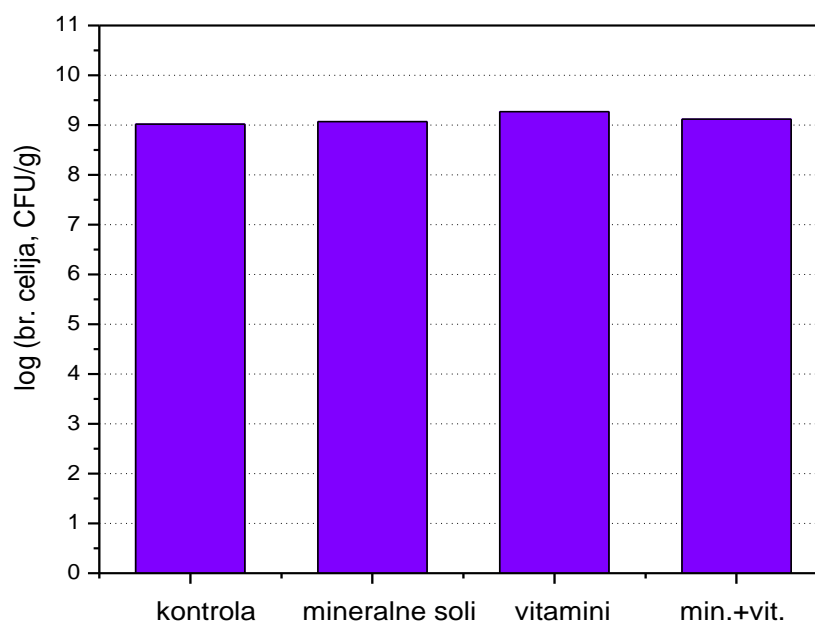
Ovaj set eksperimenata je vođen u cilju ispitivanja poboljšanja proizvodnje etanola i rasta kvasca tokom SSF procesa dodatkom različitih aktivatora (mineralnih soli i vitamina). Korišćene su optimalne koncentracije enzima Termamyl SC (0,02% v/w) i SAN Extra L (0,12% v/w), optimalna količina inokuluma od 2% (w/v) i optimalna temperatura procesa od 30 °C, određeni u prethodnim eksperimentima. Koncentracija glukoze na početku SSF procesa (nakon likvefakcije) iznosila je ~100 g/l. Početan broj ćelija kvasca je iznosio  $\sim 5 \cdot 10^7$  CFU/g čestica. Korišćeni su sledeći aktivatori kvasca:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l što odgovara koncentraciji  $\text{Mg}^{2+}$  jona od 10 mM),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l što odgovara koncentraciji  $\text{Zn}^{2+}$  jona od 1 mM), Ca-pantotenat (30 mg/l), inozitol (350 mg/l) i biotin (64  $\mu\text{g/l}$ ), i to na sledeći način – samo mineralne soli, samo vitamini i smeša mineralnih soli i vitamina. Istovremeno je izvođen SSF proces bez dodatka aktivatora (kontrolni uzorak) pod istim eksperimentalnim uslovima kako bi moglo da se izvrši poređenje rezultata. S obzirom da se prilikom svakog izvođenja alkoholne fermentacije obavezno dodaju soli: 0,4 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  i 4 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (poglavlje 4.2.6.), neophodno je naglasiti da je koncentracija jona  $\text{Mg}^{2+}$  pre dodatnog obogaćivanja hidrolizata iznosila 1,5 mM.

Sadržaj etanola i broj ćelija imobilisanog kvasca postignuti nakon 48 h SSF procesa sa dodatkom samo mineralnih soli, samo vitamina i smeše mineralnih soli i vitamina, upoređeni su sa kontrolnim uzorkom (bez aktivatora), i prikazani su na slikama 5.42. i 5.43.



Slika 5.42. Uticaj dodatka mineralnih soli, vitamina i smeše mineralnih soli i vitamina na sadržaj etanola nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna sa imobilisanim kvascem. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.40. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l), Ca-pantotenat (30 mg/l), biotin (64  $\mu\text{g/l}$ ), inozitol (350 mg/l). Brojevi iznad stubova predstavljaju procenat uvećanja sadržaja etanola u odnosu na kontrolni uzorak.

Na slici 5.42. se može videti da je maksimalni porast sadržaja etanola od 8,60% u odnosu na kontrolni uzorak postignut dodatkom samo mineralnih soli. U ovom slučaju, sadržaj etanola je iznosio 10,23% (w/w). Visoka vrednost sadržaja etanola od 9,97% (w/w) postignuta je i u uzorku sa dodatkom smeše mineralnih soli i vitamina (povećanje sadržaja etanola od 5,80% u odnosu na kontrolni uzorak). Veoma malo poboljšanje proizvodnje etanola uočeno je u uzorku sa dodatkom samo vitamina kao aktivatora (povećanje sadržaja etanola od 1,40% u odnosu na kontrolni uzorak).



Slika 5.43. Uticaj dodatka mineralnih soli, vitamina i smeše mineralnih soli i vitamina na broj ćelija imobilisanog kvasca nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.40. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori su isti kao na slici 5.42.

Ispitivajući uticaj dodatih aktivatora na rast kvasca (slika 5.43.), porast broja ćelija imobilisanog kvasca u uzorcima sa dodatkom mineralnih soli i smeše mineralnih soli i vitamina je bio prilično mali, za 0,05 i 0,10 logaritamskih jedinica u odnosu na kontrolni uzorak, respektivno. Dodatak samo vitamina kao aktivatora najviše je uticao na porast broj ćelija, i to za 0,25 logaritamskih jedinica u odnosu na kontrolni uzorak. U ovom slučaju postignut je broj ćelija od  $1,86 \cdot 10^9$  CFU/g.

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 5.42. i 5.43., dodatak mineralnih soli doprineo je maksimalnom porastu sadržaja etanola i najmanjem porastu broja ćelija u odnosu na kontrolne uzorke, jer je potrošnja supstrata bila više usmerena ka proizvodnji etanola nego ka proizvodnji biomase. Nasuprot tome, dodatak vitamina doprineo je maksimalnom porastu broja ćelija i najmanjem porastu sadržaja etanola u odnosu na kontrolne uzorke. Na osnovu ovog, mineralne soli su izabrane kao najpogodniji aktivatori za SSF proces sa imobilisanim ćelijama kvasca s obzirom da je na taj način postignuto maksimalno povećanje sadržaja etanola. Takođe, dodatak samo mineralnih soli je ekonomski povoljniji nego dodatak smeše mineralnih soli i vitamina.



Značaj dodatka mineralnih soli i vitamina i njihov uticaj na proizvodnju etanola i fiziologiju ćelija kvasca detaljnije je obrađen u odeljku 5.2.3.3., a i ispitivan je u radovima mnogih autora [115, 116, 120, 194-196].

Kao što je ranije napomenuto, Ca-alginat gel može pokazati nestabilnost u prisustvu određenih jedinjenja koja imaju veliki afinitet prema jonima  $\text{Ca}^{2+}$ , kao što su fosfati, soli mlečne i limunske kiseline i joni  $\text{K}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . S druge strane, nemoguće je izbeći prisustvo magnezijuma, fosfata i drugih nutrijenata u fermentacionom medijumu s obzirom da su oni neophodni za metabolizam i održavanje viabilnosti ćelija kvasca. U ovom radu postignuta je visoka produktivnost tokom SSF procesa, a ujedno je i dodatkom mineralnih soli u odgovarajućoj količini sačuvana fizička i hemijska stabilnost alginatnih čestica.

Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h SSF procesa sa dodatkom mineralnih soli ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) kao najpogodnijih aktivatora, upoređeni su sa kontrolnim uzorkom i prikazani su u tabeli 5.26.

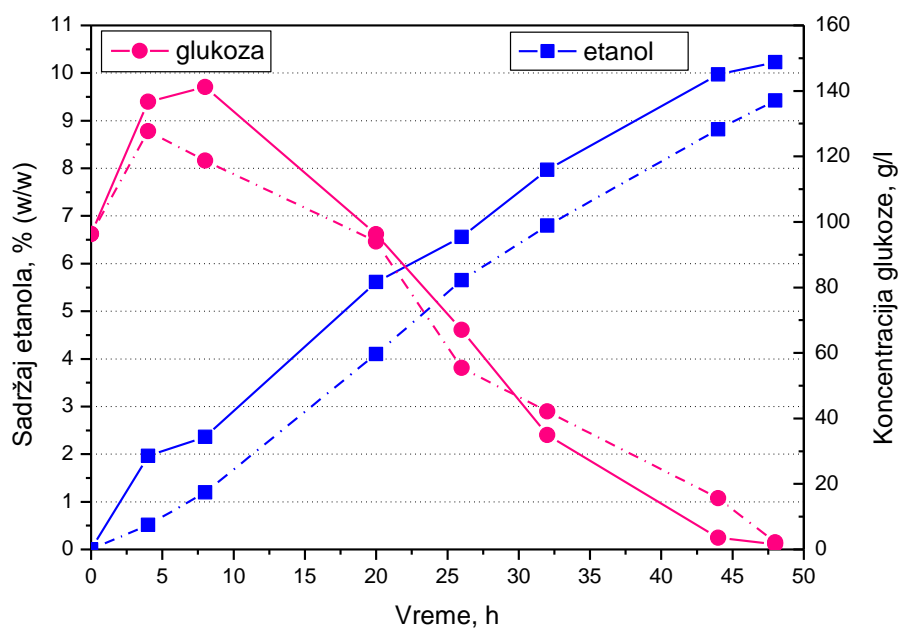
Tabela 5.26. Uticaj dodatka mineralnih soli na vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna

<b>Parametar</b>	<b>Kontrola (bez aktivatora)</b>	<b><math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> (2 g/l) + <math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> (0,3 g/l)</b>
<b>Sadržaj etanola, % (w/w)</b>	9,42	10,23
<b>Prinos etanola <math>Y_{P/S}</math>, g/g</b>	0,49	0,53
<b>Procenat od teorijskog sadrž. etanola, %</b>	86,66	94,11
<b>Vol. produktivnost P, g/l·h</b>	1,96	2,13
<b>Potrošnja glukoze, %</b>	97,72	98,32

Uslovi procesa su kao na slici 5.42.

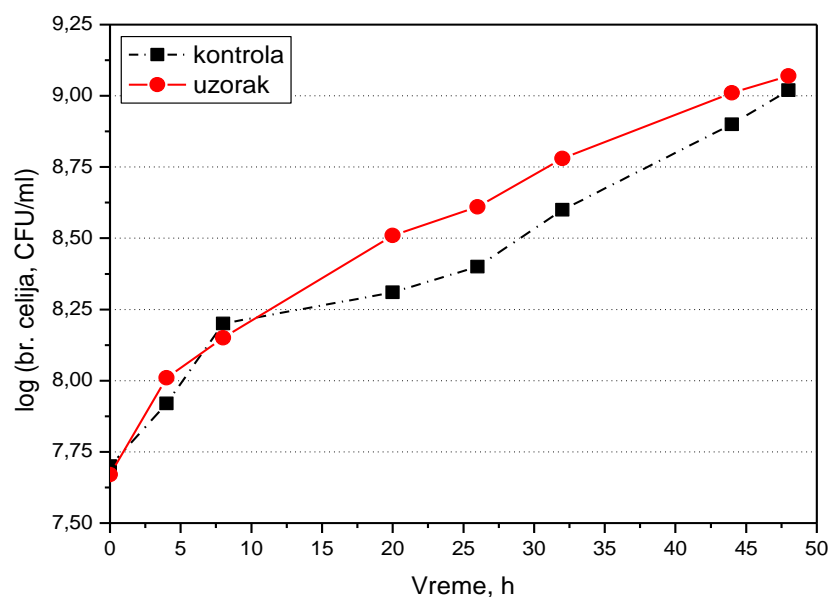
U tabeli 5.26. može se videti da je dodatak mineralnih soli ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) pored povećanja sadržaja etanola, doprineo i povećanju vrednosti ostalih procesnih parametara.

Nakon utvrđivanja da su mineralne soli ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) najpogodniji aktivatori, praćena je kinetika SSF procesa sa dodatkom istih. Sadržaj etanola, koncentracija glukoze i broj ćelija kvasca određivani su nakon 4, 8, 20, 26, 32, 44 i 48 h SSF procesa. Proizvodnja etanola, potrošnja glukoze i promena broja ćelija kvasca u toku 48 h SSF procesa sa i bez dodatka aktivatora prikazani su na slikama 5.44. i 5.45.



Slika 5.44. Kinetika proizvodnje etanola i potrošnje glukoze tokom SSF procesa kukuruznog brašna pomoću imobilisanog kvasca, sa i bez dodatka mineralnih soli. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.40. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l) i  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l). Puna linija- sa dodatkom aktivatora, isprekidna linija – kontrola (bez dodatka aktivatora).

Na slici 5.44. može se videti da je trend rasta sadržaja etanola je sličan tokom SSF procesa sa i bez dodatka aktivatora. Tokom 48 h procesa, ali i na kraju SSF procesa, sadržaj etanola je bio viši u uzorku sa dodatim aktivatorima, što je u skladu sa rezultatima prikazanim na slici 5.42. i u tabeli 5.26. Takođe se može videti da se kao i u kontrolnom uzorku bez dodatka aktivatora, vreme trajanja procesa ne može skratiti već je iznosilo 48 h.



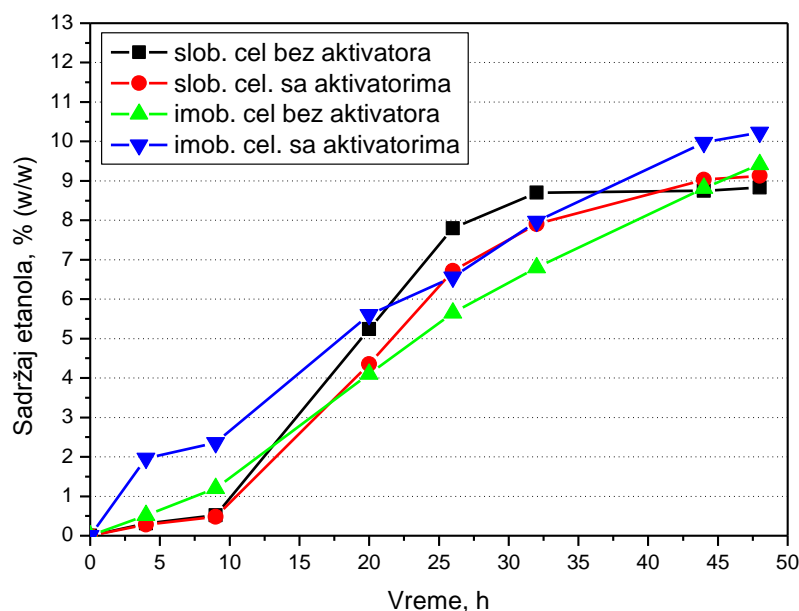
Slika 5.45. Promena broja ćelija imobilisanog kvasca u toku SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez dodatka mineralnih soli. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.40. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Aktivatori:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3 g/l) i  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2 g/l). Puna linija- sa dodatkom aktivatora, isprekidna linija – kontrola (bez dodatka aktivatora).

S obzirom da dodatak mineralnih soli nije značajno uticao na povećanje broja ćelija (slika 5.43.), to je još jednom potvrđeno rezultatima prikazanim na slici 5.45. Porast broja ćelija u odnosu na početan broj, na kraju SSF procesa bez i sa dodatkom aktivatora je bio sličan i iznosio je 1,32 i 1,4 logaritamskih jedinica, respektivno.

#### **5.2.4.6. Poređenje proizvodnje bioetanolu pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca tokom SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez dodatka aktivatora**

U ovom poglavlju sumirani su rezultati dobijeni u prethodnim eksperimentima tokom SSF procesa pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca, sa i bez dodatka aktivatora. Poređenje je izvršeno samo u slučaju SSF procesa s obzirom da se ovaj proces pokazao kod oba ćelijska sistema kao superiorniji i ekonomski povoljniji u odnosu na SHF proces sa aspekta povećanja produktivnosti i značajne uštede energije. Na slici 5.46. prikazana je promena sadržaja etanola tokom SSF procesa pri optimalnim vrednostima parametara koji su isti za oba ćelijska sistema: optimalna temperatura od 30 °C i

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2 g/l) i ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,3 g/l) kao optimalna vrsta i koncentracija aktivatora. U tabeli 5.27. prikazane su vrednosti svih značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h SSF procesa sa i bez dodatka aktivatora pri optimalnim procesnim uslovima.



Slika 5.46. Kinetika proizvodnje etanola tokom SSF procesa kukuruznog brašna sa slobodnim i imobilisanim kvascem, sa i bez dodatka aktivatora kvasca. Uslovi procesa: isti kao na slici 5.40. osim što je SSF proces izvođen na 30 °C. Optimalna vrsta i koncentracija aktivatora je ista za slobodan i imobilisan kvasac: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2 g/l) i ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,3 g/l).

Tabela 5.27. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih nakon 48 h SSF procesa kukuruznog brašna sa slobodnim i imobilisanim ćelijama kvasca na temperaturi od 30 °C, sa i bez dodatka aktivatora. Vrsta i koncentracija aktivatora kao na slici 5.46.

Parametar	Slobodni kvasac		Imobilisani kvasac	
	bez aktivatora	sa aktivatorima	bez aktivatora	sa aktivatorima
Sadržaj etanola, % (w/w)	8,83	9,13	9,42	10,23
Prinos etanola Y <sub>P/S</sub> , g/g	0,46	0,48	0,49	0,53
Procenat od teor. sadrž. etanola, %	81,23	83,99	86,66	94,11
Vol. produktivnost P, g/l·h	1,84	1,90	1,97	2,13
Potrošnja glukoze, %	98,84	99,19	97,72	98,32

Kao što je prikazano na slici 5.46., trend rasta sadržaja etanola tokom SSF procesa sa imobilisanim i slobodnim ćelijama kvasca se razlikuje. Naime, sadržaj etanola se postepeno povećavao u toku SSF procesa sa imobilisanim kvascem, bez faze opadanja, usled toga što se imobilizacijom povećala tolerantnost ćelija kvasca na etanol. U ovom slučaju, vreme trajanja procesa od 48 h nije potrebno smanjiti s obzirom da se veoma visoke vrednosti svih procesnih parametara postižu na kraju SSF procesa (tabela 5.27.). S druge strane, zbog drugačijeg trenda rasta sadržaja etanola, u prethodnim eksperimentima ustanovljeno je da je moguće skratiti vreme trajanje SSF procesa sa slobodnim ćelijama kvasca na 32 h jer nakon toga ne dolazi do značajnog porasta sadržaja etanola i drugih procesnih parametara. Sadržaj etanola nakon 48 h SSF procesa (bez dodatka aktivatora) pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca je iznosio 8,83 i 9,42% (w/w), respektivno (slika 5.46, tabela 5.27.). Takođe, maksimalne vrednosti prinosa etanola, procenta od teorijskog sadržaja etanola i volumetrijske produktivnosti postignute u imobilisanom sistemu su bile više nego u sistemu sa slobodnim ćelijama kvasca. Uzimajući u obzir sve ove činjenice, imobilisani sistem se smatra superiornijim u odnosu na sistem sa slobodnim kvascem pri izvođenju SSF procesa bez dodatka aktivatora. Važno je napomenuti da je u ovoj disertaciji takođe ispitivan i SSF proces bez dodatka aktivatora pomoću slobodnog kvasca i sa predtretmanom ultrazvukom i mirotalasima kada su nakon 48 h procesa postignute vrednosti sadržaja etanola iznosile 9,28 i 8,44% (w/w), respektivno, uz veoma izraženu inhibiciju proizvodom u slučaju primene mikrotalasa (slike 5.27. i 5.33.). Ove vrednosti sadržaja etanola su visoke, međutim primena ovih predtretmana zahteva veliki utrošak energije pa se sa energetskog i ekonomskog aspekta smatraju nepovoljnim.

Roukas [211] je objavio da je u sistemu sa imobilisanim kvascem postignut isti sadržaj etanola, ali i viši prinos etanola u poređenju sa sistemom sa slobodnim kvascem pod istim uslovima fermentacije, slično rezultatima u ovom radu. Ramakrishna i Prakasham [220] su objavili da je produktivnost proizvodnje etanola sa imobilisanim ćelijama kvasca mnogo viša nego sa slobodnim ćelijama kvasca, usled postizanja visoke koncentracije aktivnih ćelija unutar bioreaktora i određenih ćelijskih ili genetskih modifikacija indukovanih imobilizacijom. Imobilisane ćelije kvasca se takođe smatraju tolerantnijim na etanol s obzirom da ih matriks štiti od toksičnih koncentracija etanola [212, 213].

Ukoliko se uporedi promena koncentracije glukoze ostvarena tokom SSF procesa bez aktivatora sa slobodnim i imobilisanim kvascem na temperaturi od 42 °C može se uočiti razlika u trendu opadanja koncentracije (slike 5.17. i 5.40.). Tokom SSF procesa sa slobodnim kvascem nije došlo do potrošnje glukoze već se koncentracija glukoze postepeno povećavala (slika 5.17.). S druge strane, tokom SSF procesa sa imobilisanim kvascem trend opadanja koncentracije glukoze je bio sličan kao na nižim temperaturama procesa od 30 i 37 °C (slika 5.40.). Ovakvo ponašanje ukazuje na to da je kod slobodnih ćelija kvasca izraženija inhibicija visokom koncentracijom supstrata nego kod imobilisanih ćelija kvasca, a i takođe ukazuje na zaštitni efekat imobilizacije prema visokim temperaturama.

Objavljen je veliki broj kontradiktornih rezultata koji pokazuju smanjenu, nepromenjenu ili povećanu brzinu ćelijskog rasta u sistemu sa imobilisanim u odnosu na sistem sa slobodnim ćelijama kvasca [221]. Prema rezultatima u ovoj disertaciji (slike 5.18. i 5.41.), nakon 48 h SSF procesa bez aktivatora na 30 °C broj ćelija kvasca postignut u imobilisanom ćelijskom sistemu ( $1,05 \cdot 10^9$  CFU/g) je bio viši nego u slobodnom ćelijskom sistemu ( $4,47 \cdot 10^7$  CFU/ml).

Interesantna je činjenica da je maksimalni porast sadržaja etanola tokom SSF procesa i u slobodnom i u imobilisanom ćelijskom sistemu postignut dodatkom mineralnih soli kao aktivatora (slike 5.19. i 5.42., tabela 5.27.). U ovim uzorcima sadržaj etanola u imobilisanom sistemu (10,23% w/w) je bio viši nego u slobodnom ćelijskom sistemu (9,13% w/w) nakon 48 h procesa. Međutim, dodatak mineralnih soli doprineo je najmanjem porastu broja ćelija kvasca kod oba sistema (slike 5.20. i 5.43.). Vreme trajanja SSF procesa sa dodatkom aktivatora kod oba ćelijska sistema nije skraćivano i iznosilo je 48 h.

Analizom prikazanih rezultata kao ekonomski i energetske najpovoljniji postupak proizvodnje bioetanola usvojen je SSF proces sa dodatkom aktivatora pomoću imobilisanih ćelija kvasca. Prednosti ovog postupka su: veoma visok sadržaj etanola od 10,23% (w/w) nakon 48 h procesa što predstavlja 94,11% od teorijskog sadržaja etanola, povećana tolerantnost ćelija kvasca na visoke koncentracije etanola i visoke temperature usled zaštitne uloge matriksa, eliminacija inhibicije proizvodom i mogućnost ponovnog korišćenja (recirkulacije) kvasca. Takođe, imobilisane ćelije pružaju mogućnost primene i dodatnog povećanja produktivnosti u kontinualnom postupku proizvodnje bioetanola.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata eksperimentalnog rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ispitivanjem faza likvefakcije i saharifikacije dvojno-enzimske hidrolize kukuruzne krupice i kukuruznog brašna ostvarena je efikasnija hidroliza skroba, odnosno viša koncentracija i prinosi glukoze korišćenjem kukuruznog brašna kao sirovine, pri istim koncentracijama enzima Termamyl SC i SAN Extra L i istom hidromodulu. Manje dimenzije čestica i nešto viši sadržaj skroba kukuruznog brašna u odnosu na kukuruznu krupicu znatno povećavaju stepen hidrolize skroba. Kukuruzno brašno je izabrano kao sirovina za proces dobijanja bioetanola.
2. Optimizacijom faza likvefakcije i saharifikacije dvojno-enzimske hidrolize kukuruznog brašna usvojeni su sledeći optimalni parametri procesa: hidromodul 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w).
3. Ispitivanjem fermentativnih sposobnosti četiri različite vrste kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* i *Schizosaccharomyces pombe*) na hidrolizatu kukuruznog brašna, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* je pokazao najbolje fermentativne karakteristike dajući najviše vrednosti sadržaja etanola i ostalih procesnih parametara. Ovaj kvasac je korišćen u svim daljim eksperimentima kao proizvodni mikroorganizam.
4. Za izvođenje alkoholne fermentacije sa slobodnim ćelijama kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* usvojeni su sledeći optimalni parametri: početna koncentracija glukoze od 150 g/l, količina inokuluma od 2% (v/v) i vreme trajanja fermentacije od 38 h. U ovom slučaju postižu se sledeće vrednosti najvažnijih parametara alkoholne fermentacije: sadržaj etanola od 8,42% (w/w), prinos etanola od 0,44 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 77,46%, volumetrijska produktivnost od 2,21 g/l·h i potrošnja glukoze od 99,09%, kao i maksimalan broj ćelija od  $2,09 \cdot 10^8$  CFU/ml.

5. Ispitivanjem postupka odvojene saharifikacije i fermentacije (SHF) pomoću slobodnog kvasca i sa dodatkom različitih aktivatora kvasca u hidrolizat kukuruznog brašna, utvrđeno je da su najpogodniji aktivatori sledeća smeša mineralnih soli i vitamina: Ca-pantotenat (2 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l) i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l). Izborom ovih aktivatora postignut je maksimalni porast sadržaja etanola i neznatni porast broja ćelija kvasca u odnosu na kontrolni uzorak, jer je potrošnja supstrata usmerena više ka produkciji etanola nego ka stvaranju biomase. Dodatkom ovih aktivatora postignuto je povećanje vrednosti i ostalih procesnih parametara u odnosu na kontrolu. Kao kod izvođenja fermentacije bez dodatka aktivatora, tako i u ovom slučaju ekonomika proizvodnje etanola se može poboljšati skraćanjem vremena fermentacije na 38 h kada se postižu sledeće vrednosti procesnih parametara: sadržaj etanola od 9,67% (w/w), prinos etanola od 0,50 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 88,96%, volumetrijska produktivnost od 2,54 g/l·h i potrošnja glukoze od 93,69%.
6. Ispitivanjem procesa simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kukuruznog brašna pomoću slobodnog kvasca usvojena je optimalna temperatura od 30 °C i vreme trajanja procesa od 32 h. Pri ovim uslovima procesa postignute su visoke vrednosti svih procesnih parametara: sadržaj etanola od 8,70% (w/w), procenat od teorijskog sadržaja etanola od 80,04%, prinos etanola od 0,45 g/g, volumetrijska produktivnost od 2,72 g/l·h i potrošnja glukoze od 78,75%. Na ovaj način značajno se smanjuju troškovi proizvodnje etanola i postižu velike uštede energije, s obzirom da je optimalna temperatura od 30 °C znatno niža od optimalne temperature za dejstvo glukoamilaze (55 °C) u fazi saharifikacije, a takođe skraćuje se ukupno vreme procesa za 4 h tj za vreme potrebno za izvođenje saharifikacije.
7. Kao najpogodniji aktivatori kvasca pri izvođenju SSF procesa usvojene su mineralne soli:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l) i  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l) koji su doprineli povećanju sadržaja etanola i ostalih procesnih parametara. Međutim, ispitivanjem kinetike SSF procesa sa dodatkom ovih aktivatora utvrđeno je da su povećanja procesnih parametara nezadovoljavajuća i da nije moguće skratiti vreme trajanja procesa.
8. Poređenjem postupka proizvodnje etanola u SHF i SSF procesu sa slobodnim ćelijama kvasca, sa i bez dodatka aktivatora, izvođenim pri optimalnim procesnim uslovima i nakon optimalnog vremena trajanja svakog procesa, kao i analizom vrednosti svih postignutih procesnih parametara ustanovljeno je da je u proizvodnji etanola iz



- kukuruznog brašna pomoću slobodnih ćelija kvasca ekonomski najpovoljniji i najefikasniji SSF proces bez dodatka aktivatora.
9. Primenom ultrazvuka kao predtretmana povećana je efikasnost dvojno-enzimske hidrolize, kao i proizvodnje etanola tokom SSF procesa pomoću slobodnog kvasca (bez dodatka aktivatora) pri utvrđenim optimalnim parametrima soniciranja: vreme soniciranja 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC i temperatura soniciranja od 60 °C. Predtretman ultrazvukom je uticao na bolju razgradnju granula skroba, intezivnije mešanje usled akustičnih kavitacija i mikrostrujanja, otpuštanje dodatnog skroba koji je vezan za lipide i poboljšanje filtracionih osobina hidrolizata. SSF proces uz primenu predtretmana ultrazvukom se može skratiti na 32 h sa postignutim sadržajem etanola od 9,51% (w/w). Međutim, s druge strane implementacija predtretmana ultrazvukom povećava ukupne troškove proizvodnje s obzirom da soniciranje zahteva veliku potrošnju energije.
  10. Optimizacijom predtretmana mikrotalasima usvojeni su sledeći optimalni parametri: snaga mikrotalasa od 80 W i vreme dejstva 2,5 min pre i 2,5 min posle dodatka enzima Termamyl SC. Primenom ovog predtretmana maksimalni porast sadržaja etanola od 13,45% u odnosu na kontrolni uzorak postignut je nakon 32 h SSF procesa. U tom slučaju sadržaj etanola je iznosio 9,87% (w/w), a povećane su i vrednosti ostalih procesnih parametara. Predtretman mikrotalasima doprinosi efikasnijoj dvojno-enzimskoj hidrolizi, kao i većem porastu sadržaja etanola i drugih procesnih parametara tokom SSF procesa, u poređenju sa predtretmanom ultrazvukom. Iako je primena predtretmana mikrotalasima uticala na povećanje produktivnosti proizvodnje etanola, neophodno je prilikom procene ukupnih troškova proizvodnje uzeti u obzir i visoku potrošnju energije tokom mikrotalasnog zagrevanja. Stoga se primena predtretmana ultrazvukom i mikrotalasima sa energetskog i ekonomskog aspekta smatra nepovoljnom.
  11. Optimizacijom alkoholne fermentacije sa imobilisanim ćelijama kvasca usvojeni su sledeći optimalni parametri: početna koncentracija glukoze od 175 g/l, količina inokuluma od 2% (w/v) i vreme trajanja fermentacije od 38 h. U ovom slučaju postižu se sledeće vrednosti najvažnijih procesnih parametara: sadržaj etanola od 8,90% (w/w), prinos etanola od 0,46 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 81,88%, volumetrijska produktivnost od 2,34 g/l·h i potrošnja glukoze od 94,14%.

12. Poređenjem proizvodnje bioetanola pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca tokom SHF procesa, imobilisane ćelije su pokazale veću tolerantnost prema višim koncentracijama supstrata i proizvoda u odnosu na slobodne ćelije kvasca, s obzirom da je tokom fermentacije sa imobilisanim kvascem do inhibicije supstratom došlo pri početnoj koncentraciji glukoze od 200 g/l, dok su slobodne ćelije kvasca inhibirane pri početnoj koncentraciji glukoze od 175 g/l. Ćelije kvasca imobilisane u Ca-alginatu su tolerantnije na etanol s obzirom da matriks ima zaštitnu ulogu pri toksičnom delovanju visokih koncentracija etanola. Pri optimalnim parametrima usvojenim za fermentaciju sa slobodnim i imobilisanim kvascem, više vrednosti sadržaja etanola i drugih procesnih parametara postignute su sa imobilisanim ćelijama kvasca. Ovaj porast procesnih parametara nije toliko velik u šaržnom sistemu, ali mogao bi biti od velikog značaja u kontinualnom fermentacionom sistemu sa imobilisanim ćelijama, što je deo budućih istraživanja.
13. U toku alkoholne fermentacije sa recirkulacijom imobilisanih ćelija kvasca uspešno su izvedena dva ciklusa šaržne fermentacije u trajanju od po 38 h. Postignute vrednosti sadržaja etanola i drugih procesnih parametara u toku prvog ciklusa neznatno su više nego u drugom ciklusu. Ćelije kvasca imobilisane u Ca-alginatu su očuvale svoju aktivnost odnosno fizičku i hemijsku stabilnost u proizvodnji etanola tokom 3 dana, i nisu zapažena ograničenja difuzije supstrata i proizvoda. Nakon toga, na kraju drugog ciklusa, dolazi do razaranja alginatnih čestica zbog intezivnog rasta broja ćelija unutar Ca-alginata i izdvajanja gasa CO<sub>2</sub> tokom fermentacije.
14. Za proces simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kukuruznog brašna sa imobilisanim ćelijama kvasca usvojena je optimalna temperatura od 30 °C i vreme trajanja procesa od 48 h. Pri ovim uslovima procesa postignute su visoke vrednosti svih procesnih parametara: sadržaj etanola od 9,42% (w/w), prinos etanola od 0,49 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 86,66%, volumetrijska produktivnost od 1,96 g/l·h i potrošnja glukoze od 97,72%. Na ovaj način značajno se smanjuju troškovi proizvodnje etanola i postižu velike uštede energije u poređenju sa SHF procesom. Bez obzira na različiti profil promene sadržaja etanola tokom SHF i SSF procesa sa imobilisanim kvascem, krajnji sadržaj etanola nakon 48 h procesa je veoma sličan za ova dva procesa, i iznosio je 9,22 i 9,42% (w/w), respektivno.

15. Za SSF proces kukuruznog brašna sa imobilisanim ćelijama kvasca sa dodatkom aktivatora, izabrane su mineralne soli:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l) i  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l) kao aktivatori koji doprinose maksimalnom porastu sadržaja etanola i drugih procesnih parametara. Ispitivanjem kinetike ovog procesa, optimalno vreme trajanja procesa je iznosilo 48 h nakon čega se postižu sledeće vrednosti procesnih parametara: sadržaj etanola od 10,23% (w/w), prinos etanola od 0,53 g/g, procenat od teorijskog sadržaja etanola od 94,11%, volumetrijska produktivnost od 2,13 g/l·h i potrošnja glukoze od 98,92%.
16. Poređenjem proizvodnje bioetanola pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija kvasca tokom SSF procesa kukuruznog brašna sa i bez dodatka aktivatora, imobilisani ćelijski sistem se pokazao kao superiorniji.
17. Sa aspekta smanjenja ukupnih troškova proizvodnje i uštede energije, kao optimalni postupak proizvodnje bioetanola iz kukuruznog brašna usvojen je SSF proces (simultana saharifikacija i fermentacija) pomoću imobilisanih ćelija kvasca i sa dodatkom mineralnih soli kao aktivatora.

**LITERATURA**

- [1] A. Demirbas, Progress and recent trends in biofuels, Progress in Energy and Combustion Science 33 (2007) 1-18.
- [2] J. Baras, S. Gaćeša, D. Pejin, Ethanol is a strategic raw material, Chem. Ind. 56 (2002) 89-105.
- [3] "Changing the Climate: Ethanol Industry Outlook 2008", Renewable Fuels Association ([http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA\\_Outlook\\_2008.pdf](http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA_Outlook_2008.pdf))
- [4] L. Mojović i saradnici, Bioetanol kao gorivo - stanje i perspektive, Monografija, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2007.
- [5] S. Dixson-Decleve, T. Klein, L. Kiuru, C. Vona, R. Jones. The growing role of biofuels in global transport: From myth to reality. Energy and Climate (2005) 43-45 ([www.susdev.org](http://www.susdev.org).)
- [6] European Commission, Towards a European strategy for the security of energy supply- Green Paper, COM (2000) 769, ([http://europa.eu.int/comm/energy\\_transport/doc-principal/pubfinal](http://europa.eu.int/comm/energy_transport/doc-principal/pubfinal))
- [7] G. Najafpour, H. Younesi, K. Syahidah, K. Ismail. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology 92(2004) 251-260.
- [8] European Parliament & Council, Directive 2003/30EC of the European Parliament and of the Council on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport, May 2003
- [9] L. Mojović, Utilization of renewable feedstocks in Serbia, Workshop on Sustainable Plastics, EDP's and the Use of Renewable Feedstocks, organized by ICS-UNIDO and Serbian Chemical Society, Belgrade, 28-30 June 2006, Serbia and Montenegro, CD Edition
- [10] B. Pavlović, Fizika – prvi deo, Tehnološko – metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1998.

- [11] M. Nikolić, Z. Mihajlović Milanović, Š. Mandal, *Ekonomika energetike*, Ekonomski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2003.
- [12] B. Nikolić i saradnici, *Hemijsko - tehnološko - metalurški priručnik*, Jugoslovenska inženjerska akademija, Beograd, 2008.
- [13] „Key World Energy Statistics 2007“, International Energy Agency, 2007. ([http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2007/key\\_stats\\_2001.pdf](http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2007/key_stats_2001.pdf))
- [14] B. Grubor, M. Studović, D. Đurović, A. Solujić, M. Ilić, M. Paprika, Procena mogućeg nivoa proizvodnje električne energije korišćenjem OIE u Srbiji, Elaborat za Projekat br. 451-01-03059/2005-01/EE – 273019B, NIV-ITE-356, 2007.
- [15] Strategija privrednog razvoja Srbije do 2010. Knjiga I i II, izdanje MNTR Vlade Republike Srbije, Beograd, 2002., ISBN 86-7282-0526.
- [16] "World Consumption of Primary Energy by Energy Type and Selected Country Groups", Energy Information Administration, International Energy Annual 2006 (<http://www.eia.doe.gov/emeu/iea>)
- [17] B. Đorđević, V. Valent, S. Šerbanović, *Termodinamika sa termotehnikom*, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2000.
- [18] O. J. Sánchez, C. A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology* 99 (2008) 5270-5295.
- [19] S. Kim, B. E. Dale, Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass and Bioenergy* 28 (2005) 475-489.
- [20] "The Ethanol Fact Book", A Compilation of Information about Fuel Ethanol, Clean Fuels Development Coalition CFDC, 2007. (<http://www.cleanfuelsdc.org>)
- [21] "Industry Statistics: Annual World Ethanol Production by Country", Renewable Fuels Association, 2008. (<http://www.ethanolrfa.org>)
- [22] F. O. Licht, World Ethanol Production 2007 to Hit New Record, *World Ethanol and Biofuels Report* 5 (17) (2007) (<http://www.agra-net.com/portal>)
- [23] A. Walter, F. Rosillo-Calle, P. Dolzan, E. Piacente, K. Borges da Cunha, Perspectives on fuel ethanol consumption and trade, *Biomass and Bioenergy* 32 (2008) 730-748.
- [24] G. Grassi, Microdistillery for decentralised bioethanol production (Technological instrument for rural development), European Biomass Conference & Exhibition From Research to Market Deployment, Berlin, Germany, 7-11 May 2007.

- [25] „American energy: The renewable path to energy security“, Worldwatch Institute, Center for American progress ([http://www.nh.gov/oep/programs/energy/documents/American\\_Energy.pdf](http://www.nh.gov/oep/programs/energy/documents/American_Energy.pdf))
- [26] OED: I-65: America's Biofuel Corridor (<http://www.in.gov/oed/2396.htm>)
- [27] S. Kent Hoekman, Biofuels in the U.S. – Challenges and Opportunities, Renewable Energy 34 (2009) 14-22.
- [28] J. Goldemberg, The Brazilian biofuels industry, Biotechnology for Biofuels 1(6) (2008) 4096-4117.
- [29] 2007 Brazilian Energy Balance: Executive Summary, Ministério de Minas e Energia do Brasil, 2007. (<http://www.brazil.org.cn/energia/BENSumarioExec2007.htm/downloads/Executive%20Summary%20BEB%202007.pdf>)
- [30] D. Budny, P. Sotero, Brazil Institute Special Report: The Global Dynamics of Biofuels, Brazil Insitute of the Woodrow Wilson Center, 2007. ([http://www.wilsoncenter.org/topics/pubs/Brazil\\_SR\\_e3.pdf](http://www.wilsoncenter.org/topics/pubs/Brazil_SR_e3.pdf))
- [31] „America and Brazil Intersect on Ethanol“, Renewable Energy Access, 2006. (<http://www.renewableenergyworld.com/rea/news/reinsider/story?id=44896>)
- [32] „Biofuels: The Promise and the Risks“, World Development Report, The World Bank, 2008. (<http://www.econ.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL>)
- [33] R. de Miguel, Outlook for Bioethanol in Europe (Boosting Consumption), European Bioethanol Fuel Association (eBIO), World Biofuels, 2006. (<http://www.ebio.org>)
- [34] M. Enguidonas, A. Soria, B. Kavalov, P. Jensen, Techno-economic analysis of bio-alcohol production in the EU: a short summary for decision-makers, EU Comission JRC, 2002.
- [35] N. Zevgolis, European Framework for Biofuels Production and Use, Bucharest, 2004 ([http://www.enero.ro/documente\\_ENERO/European\\_exp.pdf](http://www.enero.ro/documente_ENERO/European_exp.pdf))
- [36] European Commision, DG Energy and transport, European Energy and Transport Trends to 2030 , January 2003 ([http://europa.eu.int/comm/dgs/energy\\_transport/figures/trends2030/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/dgs/energy_transport/figures/trends2030/index_en.htm))
- [37] C. Berg, World fuel ethanol analysis and outlook. The online distillery network for distilleries & fuel ethanol plants worldwide, 2004. (<http://www.distill.-com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>)

- [38] Q. Yang, B. Chen, X. Ji, Y. F. He, G. Q. Chen, Exergetic evaluation of corn-ethanol production in China, *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 14 (2009) 2450-2461.
- [39] J. Baras, S. Gaćeša, J. Jakovljević, N. Marjanović, R. Paunović, D. Pejin, R. Razmovski, Stanje i mogućnosti razvoja proizvodnje i primene etanola u Jugoslaviji, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1996.
- [40] Republički zavod za statistiku Srbije, Odeljenje statistike, industrije i energetike (<http://www.statserb.sr.gov.yu>)
- [41] D. Pejin, R. Glavardanov, S. Gaćeša, S. Popov, Alkohol za gorivo – Pogled u budućnost, V Savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sićeta, Vrnjačka Banja, 2000., str. 29-38.
- [42] Glas javnosti, septembar 2006.
- [43] P. Fudera-Luetić, Alkoholi, Tehnička enciklopedija, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1963., Knjiga 1., str. 213-216.
- [44] Tehnička studija tehnologije goriva: Program automobilske goriva. EU Final Report, decembar 2000.
- [45] D. Radonjić, Stanje i perspektive primene alternativnih goriva za pogon motornih vozila, Simpozijum istraživanja i projektovanja za privredu, Beograd, oktobar 2005., Zbornik radova, 265-275. str.
- [46] A. K. Agarwal, Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines, *Progress in Energy and Combustion Science* 33 (2007) 233-271.
- [47] L. Ryan, F. Convery, S. Ferreira, Stimulating the use of biofuels in the European Union: Implications for climate change policy, *Energy Policy* 34 (2006) 3184-3194.
- [48] A. M. Omer, Energy, environment and sustainable development, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12 (2008) 2265-2300.
- [49] P. Petrović, Trendovi kontrole emisije izduvnih gasova dizel motora sa aspekta globalnog zagađenja životne sredine, Konferencija "Životna sredina i održivi razvoj", sa međunarodnim učešćem, Beograd, 23-25. april 2007. god., rad publikovan u posebnom tematskom izdanju *Ecologica* 13 (2007) 169-175.
- [50] T. Grozdić, I. Grozdić, Uticaj zagađenja vazduha na bolesti respiratornih organa u Beogradu u periodu 2001-2006. godine, Konferencija "Životna sredina i održivi

- razvoj", sa međunarodnim učešćem, Beograd, 23-25. april 2007. god., rad publikovan u posebnom tematskom izdanju *Ecologica* 13 (2007) 165-168.
- [51] S. Kim, B. E. Dale, Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and biodiesel, *Biomass and Bioenergy* 29 (2005) 426-439.
- [52] A. Seke, D. Milovanović, L. Seke, Obrazovanje za održivi razvoj u mineralno-sirovinskom sektoru, Konferencija "Životna sredina i održivi razvoj", sa međunarodnim učešćem, Beograd, 23-25. april 2007. god., rad publikovan u posebnom tematskom izdanju *Ecologica* 14 (2007) 89-96.
- [53] The World Commission on Environment and Development: Our Common Future, Oxford New York, 1987.
- [54] V. Miltojević, I. Ilić, Culture of peace, sustainable development and realisation of millenium goals, Konferencija "Životna sredina i održivi razvoj", sa međunarodnim učešćem, Beograd, 23-25. april 2007. godine, rad publikovan u posebnom tematskom izdanju *Ecologica* 14 (2007) 69-74.
- [55] M. Roher, *The Biotechnology of Ethanol*, Wiley-VCH Verlag, 2001.
- [56] C. E. Wyman, *Handbook on Bioethanol*, Taylor and Francis, 1996.
- [57] B. Pekić, J. Kišgeci, S. Gaćeša, V. Kovač, D. Pejin, Lj. Vrbaški, Proučavanje mogućnosti proizvodnje alkohola iz topinambura kao dodatka u benzin, *Studija, Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, Novi Sad, 16 (1984) 13-69.
- [58] D. Pejin, J. Jakovljević, R. Razmovski, J. Berenji, Experiences in cultivation processing and application of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) In Yugoslavia *Studies in Plant Science*, 3, Inulin and Inulin-containing Crops, Editor Fusch A., Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1993., str. 51-57.
- [59] R. Katzen, D. A. Monceaux, Development of biocinversion of cellulosic wastes, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52 (1995) 585-592.
- [60] L. C. Wheals Basso, D. M. G. Alves and H. V. Amorim, Fuel ethanol after 25 years, *Tibtech* 17 (1999) 482-487.
- [61] P. A. M. Claassen, J. B. van Lier, A. M. Lo'pez Contreras, E. W. J. van Niel, L. Sijtsma, A. J. M. Stams, S. S. de Vries, R. A. Weusthuis, Utilisation of biomass for the supply of energy carriers, *Applied Microbiology and Biotechnology* 52 (1999) 741-755.



- [62] S. Zhu, Y. Wu, Z. Yu, X. Zhang, C. Wang, F. Yu, S. Jin, Y. Zhao, S. Tu, Y. Xue, Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol, *Biosystems Engineering* 92 (2005) 229-235.
- [63] K. Öhgren, J. Vehmaanperä, M. Siika-Aho, M. Galbe, L. Viikari, G. Zacchi, High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 607-613.
- [64] K. Öhgren, A. Rudolf, M. Galbe, G. Zacchi, Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content, *Biomass and Bioenergy* 30 (2006) 863-869.
- [65] S. Marques, L. Alves, J. C. Roseiro, F. M. Girio, Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*, *Biomass and Bioenergy* 32 (2008) 400-406.
- [66] M. R. Swain, S. Kar, A. K. Sahoo, R. C. Ray, Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Research* 162 (2007) 93-98.
- [67] M. Ballesteros, J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares, I. Ballesteros, Ethanol from lignocellulosic materials by simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, *Process Biochemistry* 39 (2004) 1843-1848.
- [68] H. K. Sreenath, R. G. Koegel, A. B. Moldes, T. W. Jeffries, R. J. Straub, Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation, *Process Biochemistry* 36 (2001) 1199-1204.
- [69] D. Mishima, M. Kuniki, K. Sei, S. Soda, M. Ike, M. Fujita, Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), *Bioresource Technology* 99 (2008) 2495-2500.
- [70] S. K. Sharma, K. L. Kalra, G. S. Kocher, Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up, *Biomass and Bioenergy* 27 (2004) 399-402.
- [71] J. Baras, S. Šušić, *Prehrambena tehnologija, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1982.*

- [72] S. Šiler-Marinković, Mikrobna biomasa, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2006.
- [73] M. L. Lazić, S. Rašković, M. Z. Stanković, V. B. Veljković, Enzimaska hidroliza krompira i dobijanje etanola, *Hemijska industrija* 58 (2004) 322-326.
- [74] D. Pejin, V. Vučurović, S. Popov, J. Dodić, S. Dodić, Production of ethanol from wheat variety Kantata, *Acta Periodica Technologica* 37 (2006) 155-161.
- [75] D. Pejin, S. Gaćeša, S. Popov, J. Baras, R. Glavardanov, J. Rac, Nova saznanja u proizvodnji etanola, VI Savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sićeta, sa međunarodnim učešćem, Poslovna zajednica Vrenje, Vrnjačka Banja, Zbornik radova, str. 7-15, 2002.
- [76] Republički zavod za statistiku Srbije, Statistika poljoprivrede, Saopštenje, ISSN 0353-9555, No 232, 2008. (<http://www.statserb.sr.gov.yu>)
- [77] D. Pejin, V. Vasić, S. Denčić, Ispitivanje mogućnosti primene hibrida raži i pšenice (tritikale) kao nove sirovine za proizvodnju etanola, Zbornik izvoda radova, VI simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj“ sa međunarodnim učešćem, Leskovac, 2005., str. 117.
- [78] D. Pejin, S. Gaćeša, S. Popov, V. Vasić, J. Dodić, S. Dodić, V. Zdravić-Nešković, Investigation of bioethanol production from *Helianthus tuberosus*, grain sorghum and sweet sorghum, Book of Abstracts of 1st South East European Congress of Chemical Engineering, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, str.196. (<http://147.91.212.197/SEECChE1/knjga.pdf>)
- [79] M. Gulati, K. Kohlmann, M. R. Ladisch, R. Hespell, R. J. Bothast, Assessment of ethanol production options for corn products, *Bioresource Technology* 58 (1996) 253-264.
- [80] S. Kim, B. E. Dale, Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass and Bioenergy* 26 (2004) 361-375.
- [81] M. Rakin, S. Nikolić, Lj. Mojović, M. Vukašinović, S. Marinković-Šiler, V. Nedović, Dobijanje bioetanola iz kukuruza primenom različitih kultura kvasaca, Racionalno korišćenje energije u metalurgiji i procesnoj industriji. Monografija, Jugoslovenska inženjerska akademija, 2006., 139-146.
- [82] R. J. Bothast, New technologies in biofuel production, Conference paper No. 32873, United States Department of Agriculture, Agricultural Outlook Forum, februar 2005.

- [83] O. Stojanović, N. Stojanović, Hemija ugljenih hidrata, Univerzitetska štampa, Beograd, 2000.
- [84] K. Jeremić, Ž. Stojanović, S. Jovanović, Modification of starch properties, Hemijska industrija 54 (2000) 438-446.
- [85] I. M. Demiate, M. Oetterer, G. Wosiacki, Characterization of chestnut (*Castanea sativa*, Mill) starch for industrial utilization, Brazilian Archives of Biology and Technology 44 (2001) 69-78.
- [86] J. W. Beishuizen, Sugar syrups from maize, (<http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/food/6F.pdf>)
- [87] L. Mojović, Renewable feedstocks and available technologies for their exploitation in Serbia and Montenegro, UNIDO (ICS-UNIDO) Expert Group Meeting on "Technologies for Exploitation of Renewable Feedstocks and Waste Valorization", Trieste, 29-31 May 2006, CD Edition.
- [88] L. Mojović, S. Nikolić, M. Rakin, M. Vukašinović, Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates, Fuel 85 (2006) 1750-1755.
- [89] V. Komolprasert, R. Y. Ofoli, Starch hydrolysis kinetics of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 51 (1991) 20-223.
- [90] S. Kendereški, Osnovi enzimologije, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1986.
- [91] M. Milijanović, Optimizacija procesa hidrolize kukuruznog brašna u cilju dobijanja bioetanola, Diplomski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2005.
- [92] M. E. van der Veen, S. Veelaert, A. J. Van der Goot, R. M. Boom, Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design, Journal of Food Engineering 75 (2006) 178-186.
- [93] R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami, B. Chauhan, Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochemistry 38 (2003) 1599-1616.
- [94] D. Norouzian, A. Akbarzadeh, J. M. Scharer, M. M. Young, Fungal glucoamylases, Biotechnology Advances 24 (2006) 80-85.
- [95] D. Bezbradica, Sinteza estara katalizovana slobodnom lipazom i lipazom imobilisanom na polimernim nosačima, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2007.

- [96] L. Mojović, Biohemijsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2006.
- [97] S. K. Khanal, M. Montalbo, J. van Leeuwen, G. Srinivasan, D. Grewell, Ultrasound enhanced glucose release from corn in ethanol plants, *Biotechnology and Bioengineering* 98 (2007) 978-985.
- [98] A. Patist, D. Bates, Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9 (2008) 147-154.
- [99] A. R. Jambrak, V. Lelas, T. J. Mason, G. Krešić, M. Badanjak, Physical properties of ultrasound treated soy proteins, *Journal of Food Engineering* 93 (2009) 386-393.
- [100] A. R. Jambrak, T. J. Mason, V. Lelas, Z. Herceg, I. Ljubić Herceg, Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions, *Journal of Food Engineering* 86 (2008) 281-287.
- [101] T. J. Mason, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics Sonochemistry* 3 (1996) 253-260.
- [102] J. Kuldiloke, Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices, *Doktorska disertacija*, Tehnički fakultet, Univerzitet u Berlinu, 2002.
- [103] Z. Zhanga, Y. Niub, S. R. Eckhoffb, H. Fenga, Sonication enhanced cornstarch separation, *Starch* 57 (2005) 240-245.
- [104] S. D. Shewale, A. B. Pandit, Enzymatic production of glucose from different qualities of grain sorghum and application of ultrasound to enhance the yield, *Carbohydrate Research* 344 (2009) 52-60.
- [105] T. Palav, K. Seetharaman, Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating, *Carbohydrate Polymers* 65 (2006) 364-370.
- [106] T. Palav, K. Seetharaman, Impact of microwave heating on the physico-chemical properties of a starch-water model system, *Carbohydrate Polymers* 67 (2007) 596-604.
- [107] S. Nikolić, L. Mojović, M. Rakin, D. Pejin, D. Savić, A microwave-assisted liquefaction as a pretreatment for the bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal, *CI&CEQ* 14 (2008) 231-234.
- [108] Z. Hu, Z. Wen, Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment, *Biochemical Engineering Journal* 38 (2008) 369-378.

- [109] I. M. Banat, P. Nigam, D. Singh, R. Marchant, A. P. McHale, Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I-Yeasts in general, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (1998) 809-821.
- [110] B. S. Dien, M. A. Cotta, T. W. Jeffries, Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status, *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (2003) 258-266.
- [111] T. Karsch, U. Stahl, K. Esser, Ethanol production by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, advantages and disadvantages, *Applied Microbiology and Biotechnology* 18 (1983) 387-391.
- [112] S. Stojaković, Optimizacija uslova alkoholnog vrenja hidrolizata kukuruznog skroba, Magistarski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2001.
- [113] M. Stojanović, M. Nikšić, Tehnološka mikrobiologija biljnih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2000.
- [114] D. Veličković, Osnovi biohemije, Univerzitetska štampa, Beograd, 2000.
- [115] S. Alfenore, C. Molina-Jouve, S. E. Guillonet, J. L. Uribelarrea, G. Goma, L. Benbadis, Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (2002) 67-72.
- [116] K. Kotarska, B. Czupryński, G. Kłosowski, Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation, *Journal of Food Engineering* 77 (2006) 965-971.
- [117] H. Wu, K. Ito, H. Shimoi, Identification and characterization of a novel biotin biosynthesis gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Environmental Microbiology* 71 (2005) 6845-5685.
- [118] K. Furukawa, H. Kitano, H. Mizoguchi, S. Hara, Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 38 (2004) 107-113.
- [119] S. Nikolić, L. Mojović, D. Pejin, M. Rakin, V. Vučurović, Improvement of ethanol fermentation of corn semolina hydrolyzates with immobilized yeast by medium supplementation, *Food Technology and Biotechnology* 47 (2009) 83-89.
- [120] R. M. Birch, G. M. Walker, Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000) 678-687.

- [121] S. Mayalagu, M. Patturajan, D. Chatterji, The presence of two tightly bound  $Zn^{2+}$  ions is essential for the structural and functional integrity of yeast RNA polymerase II, *Gene* 190 (1997) 77-85.
- [122] K. H. Sodhi, K. Sharma, J. K. Gupta, S. K. Sony, Production of a thermostable amylase from *Bacillus sp.* PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, *Process Biochemistry* 40 (2005) 525-534.
- [123] D. Pejin, R. Razmovski, Investigation of the influence of copper and calcium ions on fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized cells in the ethanol manufacturing process, *Chemical Industry* 46 (1992) 133-137.
- [124] T. Graves, N. V. Narendranath, K. Dawson, R. Power, Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33 (2006) 469-474.
- [125] D. P. Bayrock, W. M. Ingledew, Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity?, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31 (2004) 362-368.
- [126] N. V. Narendranath, R. Power, Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31 (2004) 581-584.
- [127] L. O. Ingram, Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane, *Trends in Biotechnology* 4 (1984) 40-44.
- [128] T. D'Amore, G. G. Stewart, Ethanol tolerance of yeast, *Enzyme and Microbial Technology* 9 (1987) 322-330.
- [129] H. Feldmann, *Yeast Molecular Biology*, A short compendium on basic features and novel aspects, Adolf-Butenandt Institute, University of Munich, 2005. (<http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast-Biol>)
- [130] J. Loder, *The Yeasts*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, the Netherlands, 1970.
- [131] S. Rainieri, C. Zambonelli, Y. Kaneko, Review, *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (2003) 1-9.

- [132] J. M. Guillamon, E. Barrio, T. Huerta, A. Querol, Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns, *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (1994) 708-714.
- [133] S. J. Brands, *Systema Naturae 2000 Classification*, The Taxonomicon, Amsterdam, The Netherlands (<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree>)
- [134] T. Cavalier-Smith, A revised six-kingdom system of life, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73 (1998) 203-266.
- [135] O. E. Eriksson, K. Winka, Supraordinal taxa of *Ascomycota*, *Myconet* 1 (1997) 1-16.
- [136] G. I. Naumov, S. A. James, E. S. Naumova, E. J. Luis, I. N. Roberts, Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 (2000) 1931-1942.
- [137] G. I. Naumov, H.-V. Nguyen, E. S. Naumova, A. Michel, M. Aigle, C. Gaillardin, Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast, *International Journal of Food Microbiology* 65 (2001) 163-171.
- [138] Z. Antunovics, L. Irinyi, M. Sipiczki, Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must, *Journal of Applied Microbiology* 98 (2005) 971-979.
- [139] H.-V. Nguyen, C. Gaillardin, Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species, *FEMS Yeast Research* 5 (2005) 471-483.
- [140] K. C. Fugelsang, C. G. Edwards, *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures*, Chapter I: Yeasts, Springer Science & Business Media LLC, New York, SAD, 2007.
- [141] R. F. Petersen, G. Marinoni, M. L. Nielsen, J. Piškur, Molecular approaches for analyzing diversity and phylogeny among yeast species, *Contributions to Microbiology* 5 (2000) 15-35.
- [142] <http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/genbio/energynot.html>
- [143] E. Velkov. *Enciklopedija na alkoholne napitki*, SD Vest K&C, Sofija, 1996.
- [144] K. Dawson, *The 20<sup>th</sup> Annual Alcohol School: Alcohol Production by Fermentation in the New Millennium*, October 23-27, 2000., Lexington, Kentucky, USA.

- [145] D. Singh, P. Nigam, I. M. Banat, R. Marchant, A. P. McHale, Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II-Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (1998) 823-834.
- [146] C. J. Hack, R. Marchant. Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20 (1998) 323-327.
- [147] A. Kondo, H. Shigechi, M. Abe, K. Uyama, T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, M. Kishimoto, H. Fukuda, Highlevel ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase, *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (2002) 291–296.
- [148] H. Shigechi, Y. Fujita, J. Koh, M. Ueda, H. Fukuda, A. Kondo, Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase, *Biochemical Engineering Journal* 18 (2004) 149–153.
- [149] V. Nedović, Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva, Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, 1999.
- [150] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I. M. Banat, R. Marchant, A. A. Koutinas, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology* 21 (2004) 377-397.
- [151] H. N. Öztop, A.Y. Öztop, E. Karadağ, Y. Işıkver, D. Saraydin, Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide–sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol, *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 114–119.
- [152] R. Razmovski, D. Pejin, Immobilization of *Saccharomyces diastaticus* on wood chips for ethanol production, *Folia Microbiologica* 41 (1996) 201-207.
- [153] D. Bezbradica, B. Obradović, I. Leskošek-Čukalović, B. Bugarski, V. Nedović, Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation, *Process Biochemistry* 42 (2007) 1338-1351.
- [154] S. Plessas, A. Bekatorou, A. A. Koutinas, M. Soupioni, I. M. Banat, R. Marchant, Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation, *Bioresource Technol* 98 (2007) 860-865.



- [155] A. Groboillot, D.K. Boadi, D. Poncelet, R.J. Neufeld, Immobilization of cells for application in the food industry, *Crit Rev Biotechnol* 14 (1994) 75–107.
- [156] B. Prasad, On the kinetics and effectiveness of immobilized whole-cell batch cultures, *Bioresource Technology* 53 (1995) 269-275.
- [157] R. Thatipamala, G. Hill, S. Rohani, On-line state estimation and adaptive optimization using state equations for continuous production of bioethanol, *Journal of Biotechnology* 48 (1996) 179-190.
- [158] S. Nikolić, L. Mojović, M. Rakin, D. Pejin, Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Fuel* 88 (2009) 1602-1607.
- [159] K. Öhgren, R. Bura, G. Lesnicki, J. Saddler, G. Zacchi, A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreatment corn stover, *Process Biochemistry* 42 (2007) 834-839.
- [160] F. O. Licht, World Ethanol Production, *Alcohol Journal*, Altech, 1 (1999) 6.
- [161] S. Mijović, Alternativna goriva - etanol i njegove smeše sa benzinom (drugi deo), Balkan Energy Solutions Team, (<http://www.BestEnergy.com>)
- [162] Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth completely revised edition, Vol 12, Wiley-VCH Verlag, 2003.
- [163] P. J. Westgata, M. R. Ladisch, Sorption of organics and water on starch, *Industrial and Engineering Chemistry research* 32 (1993) 1676-1680.
- [164] R. L. Belyea, K. D. Rausch, M. E. Tumbleson, Composition of corn and distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing, *Bioresource technology* 94 (2004) 293-298.
- [165] J. Kim, B. Kim, Ch. Lee, S. Kim, H. Jee, J. Koh, A. Fane, Development of clean technology in alcohol fermentation industry, *Journal of Cleaner Production* 5 (1997) 263-267.
- [166] <http://www.abengoabioenergy.com/coproducts/>
- [167] M. Tasić, I. Banković-Ilić, M. Lazić, V. Veljković, L. Mojović, Bioetanol - stanje i perspektive, *Hemijska industrija* 60 (1-2) (2006) 1-9.
- [168] A. K. Chandel, E. S. Chan, R. Ravinder, P. N. Lakshmi, L. R. Venkateswar, P. Ravindra, Economics and environmental impact of bioethanol production

- technologies: an appraisal, *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2 (2007) 14-32.
- [169] European Biomass Industry Association (EUBIA), Economics (<http://www.eubia.org/189.0.html>)
- [170] H. Shapouri, M. Salassi, N. Fairbanks, The economic feasibility of ethanol production from sugar in the United States, Office of Energy Policy and New Uses, Office of the Chief Economist U. S. Department of Agriculture and Louisiana State University, 2006.
- [171] NCEP Staff Perspective on Bioenergy, National Commission on Energy Policy, Washington DC, SAD, 2004. ([http://www.engineering.dartmouth.edu/rbaef/meeting/kodjak\\_ppt.pdf](http://www.engineering.dartmouth.edu/rbaef/meeting/kodjak_ppt.pdf))
- [172] J. Baras, G. Kukić, S. Šiler-Marinković, Prehrambena tehnologija sa praktikumom, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1992.
- [173] K. C. Thomas, S. H. Hynes, W. M. Ingledew, Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation, *Review, Process Biochemistry* 31 (1996) 321-331.
- [174] B. Çaylak, F. V. Sukan, Comparison of different production processes for bioethanol, *Turkish Journal of Chemistry* 22 (1998) 351-359.
- [175] G. L. Miller, Use of dinitrosalicilic acid for determining reducing sugars, *Anal Chem.* 31 (1959) 426-428.
- [176] J. Rajković, M. Mirić, J. Baras, Analiza životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1983.
- [177] M. Govedarica, M. Jarak, Praktikum iz mikrobiologije, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 1999.
- [178] Determination of starch, Polarimetric method, Annex I, Commission Directive 1999/79/EC, Official Journal of the European Communities, 1999.
- [179] T. Kolusheva, A. Marinova, A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable  $\alpha$ -amylase, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 42 (2007) 93-96.
- [180] D. Yankov, E. Dobрева, V. Beschkov, E. Emanuilova, Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable  $\alpha$ -amylase, *Enzyme and Microbial Technology* 8 (1986) 665-667.

- [181] V. Arasaratnam, K. Balasubramaniam, Synergistic action of alpha-amylase and glycoamylase on raw corn, *Starch/Starke* 45 (1993) 231-233.
- [182] D. K. Apar, B. Özbek,  $\alpha$ -amylase inactivation during corn starch hydrolysis process, *Process Biochemistry* 39 (2004) 1877-1892.
- [183] S. D. Textor, G. A. Hill, D. G. Macdonald, E. S. Denis, Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules, *Canadian Journal of Chemical Engineering* 76 (1998) 87-93.
- [184] Z. Bebić, J. Jakovljević, J. Baras, Hidrolizati kukuruznog skroba kao fermentacioni supstrati za proizvodnju etanola, *Hemijska industrija* 54 (2000) 5-9.
- [185] P. V. Aiyer, Amylases and their applications, Review, *African Journal of Biotechnology* 4 (2005) 1525-1529.
- [186] T. Montesinos, J-M. Navarro, Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme and Microbial Technology* 27 (2000) 362-370.
- [187] T. J. Xu, X. Q. Zhao, F. W. Bai, Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors, *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005) 634-640.
- [188] B. G. Dettori-Camus, F. G. Priest, J. R. Stark, Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26, *Process Biochemistry* 27 (1992) 17-21.
- [189] M. Karakatsanis, M. Liakopoulou-Kyriakides, Comparative study of hydrolysis of various starches by alpha amylase and glucoamylase in PEG-dextran and PEG-substrate aqueous two phase systems, *Starch/Starke* 50 (1998) 194-199.
- [190] W. O. Okunowo, A. A. Osuntoki, Quantitation of alcohols in orange wine fermented by four strains of yeast, *African Journal of Biochemical Research* 1 (2007) 95-100.
- [191] R. Thatipamala, S. Rohani, G. A. Hill, Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation, *Biotechnology and Bioengineering* 40 (1992) 289-297.
- [192] S. Ozmihci, F. Kargi, Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations, *Bioresource Technology* 98 (2007) 2978-2984.
- [193] P. F. Siqueira, S. G. Karp, J. C. Carvalho, W. Sturm, J. A. Rodríguez-León, J-L. Tholozan, R. R. Singhanian, A. Pandey, C. R. Soccol, Production of bio-ethanol from

- soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales, *Bioresource Technol*, 99 (2008) 8156-8163.
- [194] E. M. R Rees, G. G. Stewart, The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts, *Journal of the Institute of Brewing* 103 (1999) 287-291.
- [195] K. M. Dombek, L. O. Ingram, Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation, *Applied and Environmental Microbiology* 52 (1986) 975–981.
- [196] E. Magonet, P. Hayen, D. Delforge, E. Delaive, J. Remacle, Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Journal of Biochemistry* 287 (1992) 361-365.
- [197] N. K. Sree, M. Sridhar, K. Suresh, L.V. Rao, High ethanol production by solid substrate fermentation from starchy substrates using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioprocess Engineering* 20 (1999) 561-563.
- [198] Zs. Kádár, Zs. Szengyel, K. Réczey, Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol, *Ind. Crop. Prod.* 20 (2004) 103-110.
- [199] M. Phisalaphong, N. Srirattana, W. Tanthapanichakoon, Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 28 (2006) 36-43.
- [200] T. A. McMeekin, J. Olley, D. A. Ratkowsky, T. Ross, Predictive microbiology: towards the interface and beyond, *International Journal of Food Microbiology* 73 (2002) 395-407.
- [201] M. J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón, A. Mas, Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology* 80 (2003) 47-53.
- [202] P. Lucero, E. Peñalver, E. Moreno, R. Lagunas, Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 4456-4461.
- [203] G. M. Walker, R. De Nicola, S. Anthony, R. Learmonth, Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations, Institute of Brewing and Distilling Asia Pacific Section 2006 Convention, 19-24. mart 2006., Hobart, Tasmania

- [204] J. C. Bohlscheid, J. K. Fellman, X. D. Wang, D. Ansen, C.G. Edwards, The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations, *Journal of Applied Microbiology* 102 (2006) 390-400.
- [205] Z. Chi, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 22 (1999) 58-63.
- [206] J. Zhao, L. Xia, Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain, *Fuel Processing Technology* 90 (2009) 1193-1197.
- [207] J. K. Ko, J. S. Bak, M. W. Jung, H. J. Lee, I. Choi, T. H. Kim, K. H. Kim, Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes, *Bioresource Technology* 100 (2009) 4374-4380.
- [208] S. Srichuwong, M. Fujiwara, X. Wang, T. Seyama, R. Shiroma, M. Arakane, N. Mukojima, K. Tokuyasu, Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol, *Biomass and Bioenergy* 33 (2009) 890-898.
- [209] L. C. Dickey, P. H. Cooke, M. J. Kurantz, A. McAloon, N. Parris, R. A. Moreau, Using microwave heating and microscopy to estimate optimal corn germ oil yield with a bench-scale press, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84 (2007) 489-495.
- [210] R. Wendhausen, A. Fregonesi, P. J. S. Moran, I. Joekes, J. Augusto, R. Rodrigues, E. Tonella, K. Althoff, Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (2001) 48-52.
- [211] T. Roukas, Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture, *Journal of Food Engineering* 27 (1996) 87-96.
- [212] Z. Ciesarová, Z. Dömény, D. Šmogrovičová, J. Pátková, E. Šturdík, Comparison of ethanol tolerance of free and immobilized *Saccharomyces uvarum* yeasts, *Folia Microbiologica* 43 (1998) 55-58.
- [213] P. J. Verbelen, D. P. De Schutter, F. Delvaux, K. J. Verstrepen, F. R. Delvaux, Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications, *Biotechnology Letters* 28 (2006) 1515-1525.

- [214] M. Bekers, J. Laukevics, A. Karsakevich, E. Ventina, E. Kaminska, D. Upite, I. Vina, R. Linde, R. Scherbaka, Levam-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment, *Process Biochemistry* 36 (2001) 979-986.
- [215] H. Kurosawa, M. Matsumura H. Tanaka, Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells, *Biotechnology and Bioengineering* 34 (1989) 926-932.
- [216] A. Margaritis, P. M. Kilonzo, Production of ethanol using immobilised cell bioreactor systems. U: Nedović V, Willaert R, editors. *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, Netherlands: Springer; 2005, str. 375-405.
- [217] C. Vogelsang, R. H. Wijffels, K. Østgaard, Rheological properties and mechanical stability of new gel-entrapment system applied in bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering* 70 (2000) 247-253.
- [218] N. K. Sree, M. Sridhar, K. Suresh, I. M. Banat, L. Venkateswar Rao, High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24 (2000) 222-226.
- [219] R. Liu, F. Shen, Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308), *Bioresource Technology* 99 (2008) 847-854.
- [220] S. V. Ramakrishna, R. S. Prakasham, Microbial fermentation with immobilized cells, *Current Science* 77 (1999) 87-100.
- [221] G.-A. Junter, L. Coquet, S. Vilain, T. Jouenne, Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics, *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002) 201-212.

***PRILOG***

**TABLICA I**  
**Određivanje sadržaja etanola u smeši etanol-voda**  
**iz gustine na 20°C-**  
**-po K.Rauscher-u i J. Voigt-u**

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>
0,9999	0,06	0,07	0,05	0,9959	2,22	2,80	2,21
8	0,11	0,13	0,11	8	2,28	2,88	2,27
7	0,16	0,20	0,16	7	2,34	2,95	2,33
6	0,21	0,27	0,21	6	2,40	3,02	2,38
5	0,27	0,34	0,27	5	2,45	3,09	2,44
4	0,32	0,40	0,32	4	2,50	3,16	2,49
3	0,37	0,47	0,37	3	2,56	3,23	2,55
2	0,43	0,54	0,43	2	2,62	3,30	2,61
1	0,48	0,61	0,48	1	2,68	3,37	2,66
0	0,53	0,67	0,53	0	2,73	3,44	2,72
0,9989	0,59	0,74	0,58	0,9949	2,79	3,52	2,78
8	0,64	0,81	0,64	8	2,85	3,59	2,83
7	0,70	0,88	0,69	7	2,91	3,66	2,89
6	0,75	0,94	0,74	6	2,97	3,73	2,94
5	0,80	1,01	0,80	5	3,02	3,80	3,00
4	0,86	1,08	0,85	4	3,08	3,87	3,06
3	0,91	1,15	0,90	3	3,14	3,95	3,12
2	0,96	1,21	0,96	2	3,20	4,02	3,17
1	1,01	1,28	1,01	1	3,26	4,10	3,23
0	1,07	1,35	1,06	0	3,32	4,17	3,29
0,9979	1,13	1,42	1,12	0,9939	3,37	4,24	3,35
8	1,18	1,49	1,17	8	3,43	4,32	3,41
7	1,24	1,56	1,23	7	3,49	4,39	3,47
6	1,29	1,62	1,28	6	3,55	4,47	3,52
5	1,34	1,69	1,34	5	3,61	4,54	3,58
4	1,40	1,76	1,39	4	3,67	4,62	3,64
3	1,45	1,83	1,45	3	3,73	4,69	3,70
2	1,51	1,90	1,50	2	3,79	4,76	3,76
1	1,56	1,97	1,55	1	3,85	4,84	3,82
0	1,62	2,04	1,61	0	3,91	4,91	3,87
0,9969	1,67	2,11	1,66	0,9929	3,97	4,99	3,93
8	1,73	2,18	1,72	8	4,03	5,06	3,99
7	1,78	2,24	1,77	7	4,09	5,14	4,14
6	1,83	2,31	1,83	6	4,15	5,21	4,11
5	1,89	2,38	1,88	5	4,21	5,29	4,17
4	1,94	2,45	1,94	4	4,27	5,36	4,23
3	2,00	2,52	1,99	3	4,34	5,44	4,29
2	2,06	2,59	2,05	2	4,40	5,51	4,35
1	2,11	2,66	2,10	1	4,46	5,59	4,41
0	2,17	2,73	2,16	0	4,52	5,67	4,47



$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>
0,9919	4,58	5,74	4,53	0,9879	7,11	8,88	7,01
8	4,64	5,82	4,59	8	7,18	8,96	7,07
7	4,70	5,89	4,65	7	7,25	9,05	7,14
6	4,76	5,97	4,71	6	7,31	9,13	7,20
5	4,82	6,04	4,77	5	7,38	9,21	7,27
4	4,88	6,12	4,83	4	7,44	9,29	7,27
3	4,94	6,19	4,89	3	7,51	9,37	7,40
2	5,00	6,27	4,95	2	7,58	9,46	7,46
1	5,07	6,35	5,01	1	7,64	9,54	7,53
0	5,13	5,74	5,00	0	7,71	9,62	7,59
0,9909	5,19	6,50	5,13	0,9869	7,77	9,70	7,66
8	5,25	6,58	5,19	8	7,84	9,78	7,72
7	5,32	6,66	5,26	7	7,91	9,87	7,79
6	5,38	6,74	5,32	6	7,98	9,95	7,85
5	5,44	6,81	5,38	5	8,04	10,03	7,92
4	5,50	6,89	5,44	4	8,11	10,11	7,99
3	5,56	6,97	5,50	3	8,18	10,20	8,05
2	5,62	7,05	5,56	2	8,24	10,28	8,12
1	5,68	7,12	5,62	1	8,31	10,37	8,19
0	5,75	7,20	5,68	0	8,38	10,45	8,25
0,9899	5,82	7,28	5,75	0,9859	8,45	10,54	8,32
8	5,88	7,36	5,81	8	8,52	10,62	8,39
7	5,94	7,43	5,87	7	8,59	10,71	8,45
6	6,00	7,51	5,93	6	8,66	10,79	8,52
5	6,07	7,59	5,99	5	8,73	10,88	8,59
4	6,13	7,67	6,05	4	8,80	10,96	8,65
3	6,20	7,75	6,12	3	8,87	11,05	8,72
2	6,26	7,83	6,18	2	8,94	11,13	8,79
1	6,32	7,91	6,24	1	9,01	11,22	8,85
0	6,39	7,99	6,31	0	9,08	11,30	8,92
0,9889	6,45	8,07	6,37	0,9849	9,15	11,39	8,99
8	6,52	8,15	6,43	8	9,21	11,47	9,06
7	6,59	8,24	6,50	7	9,28	11,56	9,12
6	6,66	8,32	6,56	6	9,35	11,64	9,19
5	6,72	8,40	6,62	5	9,42	11,73	9,26
4	6,78	8,48	6,69	4	9,49	11,81	9,33
3	6,85	8,56	6,75	3	9,56	11,90	9,40
2	6,91	8,64	6,81	2	9,63	11,99	9,46
1	6,98	8,72	6,88	1	9,70	12,07	9,53
0	7,04	8,80	6,94	0	9,77	12,16	9,60

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>
<b>0,9839</b>	9,84	12,24	9,67	<b>0,9799</b>	12,77	15,84	12,50
8	9,91	12,33	9,73	8	12,86	15,93	12,58
7	9,98	12,41	9,80	7	12,93	16,02	12,65
6	10,05	12,50	9,87	6	13,01	16,11	12,72
5	10,12	12,59	9,94	5	13,08	16,20	12,79
4	10,20	12,68	10,01	4	13,16	16,30	12,87
3	10,27	12,77	10,08	3	13,24	16,39	12,94
2	10,34	12,86	10,15	2	13,31	16,48	13,01
1	10,42	12,95	10,22	1	13,39	16,58	13,09
0	10,49	13,04	10,29	0	13,47	16,67	13,16
<b>0,9829</b>	10,56	13,13	10,36	<b>0,9789</b>	13,54	16,76	13,23
8	10,63	13,21	10,43	8	13,61	16,85	13,20
7	10,70	13,30	10,50	7	13,69	16,95	13,38
6	10,78	13,39	10,57	6	13,77	17,04	13,45
5	10,85	13,48	10,64	5	13,84	17,13	13,45
4	10,93	13,57	10,71	4	13,92	17,23	13,60
3	11,00	13,66	10,78	3	14,00	17,32	13,67
2	11,08	13,75	10,85	2	14,08	17,41	13,74
1	11,15	13,84	10,92	1	14,16	17,51	13,82
0	11,22	13,93	10,99	0	14,23	17,60	13,89
<b>0,9819</b>	11,29	14,02	11,06	<b>0,9779</b>	14,31	17,70	13,97
8	11,37	14,11	11,14	8	14,39	17,79	14,04
7	11,44	14,20	11,21	7	14,46	17,88	14,12
6	11,51	14,29	11,28	6	14,54	17,98	14,19
5	11,59	14,38	11,35	5	14,62	18,07	14,27
4	11,66	14,47	11,42	4	14,69	18,16	14,34
3	11,73	14,56	11,49	3	14,77	18,26	14,42
2	11,81	14,65	11,57	2	14,85	18,35	14,49
1	11,88	14,74	11,64	1	14,93	18,45	14,57
0	11,95	14,83	11,71	0	15,01	18,54	14,64
<b>0,9809</b>	12,03	14,92	11,78	<b>0,9769</b>	15,08	18,63	14,71
8	12,10	15,01	11,85	8	15,16	18,73	14,79
7	12,18	15,10	11,92	7	15,24	18,82	14,86
6	12,25	15,19	12,00	6	15,32	18,91	14,93
5	12,33	15,29	12,07	5	15,40	19,01	15,01
4	12,41	15,38	12,14	4	15,47	19,10	15,08
3	12,48	15,47	12,21	3	15,54	19,19	15,15
2	12,55	15,56	12,29	2	15,62	19,28	15,22
1	12,63	15,65	12,36	1	15,70	19,38	15,30
0	12,70	15,74	12,43	0	15,78	19,47	15,37

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>
<b>0,9759</b>	15,85	19,56	15,44	<b>0,9719</b>	18,91	23,24	18,35
8	15,93	19,66	15,52	8	18,98	23,33	18,42
7	16,01	19,75	15,59	7	19,06	23,42	18,49
6	16,08	19,84	15,66	6	19,14	23,51	18,56
5	16,16	19,93	15,74	5	19,21	23,60	18,63
4	16,23	20,02	15,81	4	19,29	23,69	18,70
3	16,31	20,12	15,88	3	19,36	23,78	18,77
2	16,39	20,21	15,96	2	19,44	23,87	18,84
1	16,46	20,30	16,03	1	19,51	23,96	18,91
0	16,54	20,39	16,10	0	19,58	24,04	18,98
<b>0,9749</b>	16,61	20,48	16,16	<b>0,9709</b>	19,66	24,13	19,05
8	16,69	20,57	16,25	8	19,73	24,22	19,12
7	16,77	20,67	16,32	7	19,81	24,31	19,19
6	16,85	20,76	16,39	6	19,88	24,40	19,26
5	16,92	20,85	16,47	5	19,96	24,49	19,33
4	16,99	20,94	16,54	4	20,03	24,58	19,40
3	17,07	21,03	16,61	3	20,11	24,67	19,47
2	17,15	21,13	16,68	2	20,18	24,75	19,54
1	17,23	21,22	16,76	1	20,25	24,84	19,61
0	17,30	21,31	16,83	0	20,32	24,93	19,68
<b>0,9739</b>	17,38	21,41	16,90	<b>0,9699</b>	20,40	25,02	19,75
8	17,46	21,50	16,97	8	20,47	25,10	19,82
7	17,53	21,59	17,05	7	20,54	25,19	19,89
6	17,61	21,68	17,12	6	20,62	25,28	19,95
5	17,69	21,78	17,19	5	20,69	25,36	20,02
4	17,77	21,87	17,26	4	20,76	25,45	20,09
3	17,84	21,96	17,34	3	20,84	25,54	20,16
2	17,93	22,06	17,41	2	20,91	25,63	20,23
1	18,00	22,15	17,48	1	20,98	25,71	20,30
0	18,08	22,24	17,55	0	21,06	25,80	20,37
<b>0,9729</b>	18,15	22,33	17,62	<b>0,9689</b>	21,13	25,89	20,44
8	18,23	22,42	17,70	8	21,20	25,97	20,50
7	18,30	22,51	17,77	7	21,27	26,06	20,57
6	18,38	22,60	17,84	6	21,34	26,14	20,64
5	18,45	22,69	17,91	5	21,42	26,23	20,71
4	18,53	22,78	17,98	4	21,49	26,31	20,77
3	18,61	22,88	18,06	3	21,56	26,40	20,84
2	18,68	22,97	18,13	2	21,63	26,48	20,91
1	18,76	23,06	18,20	1	21,70	26,57	20,97
0	18,83	23,15	18,27	0	21,77	26,65	21,04

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>
0,9679	21,85	26,74	21,11	0,9639	24,63	30,02	23,70
8	21,92	26,82	21,18	8	24,70	30,10	23,76
7	21,99	26,91	21,24	7	24,77	30,18	23,83
6	22,06	26,99	21,31	6	24,83	30,26	23,89
5	22,13	27,07	21,38	5	24,90	30,34	23,95
4	22,20	27,16	21,44	4	24,97	30,42	24,02
3	22,27	27,24	21,51	3	25,04	30,50	24,08
2	22,34	27,32	21,57	2	25,11	30,58	24,14
1	22,41	27,41	21,64	1	25,17	30,65	24,20
0	22,48	27,49	21,70	0	25,23	30,73	24,26
0,9669	22,55	27,57	21,77	0,9629	25,30	30,81	24,32
8	22,62	27,66	21,84	8	25,37	30,89	24,38
7	22,69	27,74	21,90	7	25,43	30,96	24,44
6	22,77	27,83	21,97	6	25,50	31,04	24,50
5	22,84	27,91	22,03	5	25,57	31,12	24,57
4	22,91	27,99	22,10	4	25,64	31,20	24,63
3	22,98	28,08	22,16	3	25,70	31,27	24,69
2	23,05	28,16	22,23	2	25,77	31,35	24,75
1	23,12	28,24	22,29	1	25,83	31,43	24,81
0	23,19	28,32	22,36	0	25,90	31,51	24,87
0,9659	23,26	28,41	22,42	0,9619	25,96	31,58	24,93
8	23,33	28,49	22,49	8	26,03	31,66	24,99
7	23,40	28,57	22,55	7	26,09	31,73	25,05
6	23,46	28,65	22,62	6	26,16	31,81	25,11
5	23,53	28,73	22,68	5	26,22	31,88	25,17
4	23,60	28,82	22,74	4	26,29	31,96	25,23
3	23,67	28,90	22,81	3	26,35	32,03	25,28
2	23,74	28,98	22,87	2	26,42	32,11	25,34
1	23,81	29,06	22,94	1	26,48	32,18	25,40
0	23,88	29,15	23,00	0	26,55	32,26	25,46
0,9649	23,95	29,23	23,07	0,9609	26,61	32,33	25,52
8	24,02	29,31	23,13	8	26,67	32,40	25,58
7	24,09	29,39	23,19	7	26,74	32,48	25,64
6	24,16	29,47	23,26	6	26,80	32,55	25,70
5	24,23	29,55	23,32	5	26,86	32,63	25,75
4	24,30	29,63	23,38	4	26,92	32,70	25,81
3	24,36	29,71	23,45	3	26,99	32,78	25,87
2	24,43	29,79	23,51	2	27,05	32,85	25,93
1	24,50	29,87	23,57	1	27,12	32,92	25,99
0	24,56	29,94	23,64	0	27,18	33,00	26,05

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zaprem. %	g u 100 cm <sup>3</sup>
<b>0,9599</b>	27,24	33,07	26,10	<b>0,9559</b>	29,72	35,92	28,36
8	27,30	33,14	26,16	8	29,78	35,99	28,41
7	27,37	33,22	26,22	7	29,84	36,06	28,47
6	27,43	33,29	26,28	6	29,90	36,13	28,52
5	27,50	33,36	26,34	5	29,96	36,20	28,58
4	27,56	33,44	26,39	4	30,02	36,27	28,63
3	27,62	33,51	26,45	3	30,08	36,34	28,68
2	27,68	33,58	26,51	2	30,14	36,40	28,74
1	27,75	33,66	26,57	1	30,20	36,47	28,79
0	27,81	33,73	26,63	0	30,26	36,54	28,84
<b>0,9589</b>	27,87	33,80	26,68	<b>0,9549</b>	30,32	36,61	28,89
8	27,94	33,88	26,74	8	30,37	36,67	28,95
7	28,00	33,95	26,80	7	30,43	36,74	29,00
6	28,06	34,02	26,86	6	30,49	36,81	29,05
5	28,13	34,09	26,91	5	30,55	36,87	29,11
4	28,19	34,16	26,97	4	30,61	36,94	29,16
3	28,25	34,23	27,02	3	30,67	37,01	29,21
2	28,32	34,31	27,08	2	30,72	37,07	29,27
1	28,38	34,38	27,14	1	30,78	37,14	29,32
0	28,44	34,45	27,19	0	30,84	37,21	29,37
<b>0,9579</b>	28,50	34,52	27,25	<b>0,9539</b>	30,90	37,28	29,42
8	28,56	34,59	27,30	8	30,96	37,34	29,48
7	28,62	34,66	27,36	7	31,02	37,41	29,53
6	28,68	34,73	27,41	6	31,08	37,48	29,58
5	28,74	34,80	27,47	5	31,13	37,54	29,63
4	28,81	34,88	27,53	4	31,19	37,61	29,69
3	28,87	34,95	27,58	3	31,25	37,67	29,74
2	28,93	35,02	27,64	2	31,31	37,74	29,79
1	28,99	35,09	27,69	1	31,36	37,80	29,84
0	29,05	35,16	27,75	0	31,42	37,87	29,90
<b>0,9569</b>	29,11	35,23	27,81	<b>0,9529</b>	31,48	37,93	29,95
8	29,15	35,30	27,86	8	31,54	38,00	30,00
7	29,23	35,37	27,92	7	31,60	38,07	30,03
6	29,30	35,44	27,93	6	31,65	38,13	30,10
5	29,36	35,51	28,03	5	31,71	38,20	30,16
4	29,42	35,58	28,08	4	31,77	38,26	30,21
3	29,48	35,65	28,14	3	31,83	38,33	30,26
2	29,54	35,72	28,19	2	31,88	38,39	30,31
1	29,60	35,78	28,25	1	31,94	38,46	30,37
0	29,66	35,85	28,30	0	32,00	38,52	30,42

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>
<b>0,9519</b>	32,06	38,59	30,47	<b>0,9479</b>	34,28	41,09	32,44
8	32,11	38,65	30,52	8	34,33	41,15	32,48
7	32,17	38,72	30,57	7	34,39	41,21	32,53
6	32,23	38,78	30,62	6	34,44	41,27	32,58
5	32,38	38,84	30,67	5	34,49	41,33	32,63
4	32,34	38,91	30,72	4	34,55	41,39	32,67
3	32,39	38,97	30,77	3	34,60	41,45	32,72
2	32,45	39,03	30,82	2	34,66	41,51	32,77
1	32,51	39,10	30,87	1	34,71	41,57	32,82
0	32,57	39,16	30,91	0	34,76	41,63	32,86
<b>0,9509</b>	32,63	39,23	30,96	<b>0,9469</b>	34,82	41,69	32,91
8	32,68	39,29	31,01	8	34,87	41,75	32,96
7	32,73	39,35	31,06	7	34,92	41,81	33,01
6	32,79	39,42	31,11	6	34,98	41,87	33,05
5	32,85	39,48	31,16	5	35,03	41,93	33,10
4	32,90	39,54	31,21	4	35,09	41,99	33,15
3	32,96	39,61	31,26	3	35,14	42,05	33,19
2	33,01	39,67	31,31	2	35,19	42,11	33,24
1	33,07	39,73	31,36	1	35,24	42,16	33,29
0	33,12	39,79	31,41	0	35,29	42,22	33,33
<b>0,9499</b>	33,18	39,86	31,46	<b>0,9459</b>	35,35	42,28	33,38
8	33,24	39,92	31,51	8	35,40	42,34	33,42
7	33,29	39,98	31,56	7	35,45	42,40	33,47
6	33,35	40,04	31,61	6	35,51	42,46	33,52
5	33,41	40,11	31,66	5	35,56	42,51	33,56
4	33,46	40,17	31,71	4	35,61	42,57	33,61
3	33,52	40,23	31,75	3	35,66	42,63	33,66
2	33,57	40,29	31,80	2	35,72	42,69	33,70
1	33,62	40,35	31,85	1	35,77	42,75	33,75
0	33,68	40,42	31,90	0	35,82	42,81	33,79
<b>0,9489</b>	33,73	40,48	31,95	<b>0,9459</b>	35,87	42,86	33,84
8	33,79	40,54	32,00	8	35,93	42,92	33,89
7	33,84	40,60	32,05	7	35,98	42,98	33,93
6	33,90	40,67	32,10	6	36,03	43,04	33,98
5	33,96	40,73	32,15	5	36,08	43,10	34,03
4	34,01	40,79	32,30	4	36,14	43,16	34,07
3	34,06	40,85	32,35	3	36,19	43,22	34,12
2	34,12	40,91	32,29	2	36,24	43,27	34,27
1	34,17	40,97	32,34	1	36,29	43,33	34,21
0	34,23	41,03	32,39	0	36,35	43,39	34,25

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>
<b>0,9439</b>	36,40	43,45	34,30	<b>0,9399</b>	38,46	45,71	36,08
8	36,46	43,51	34,35	8	38,51	45,77	36,13
7	36,51	43,57	34,39	7	38,56	45,82	36,17
6	36,56	43,62	34,44	6	38,61	45,88	36,21
5	36,61	43,68	34,48	5	38,66	45,93	36,26
4	36,66	43,74	34,53	4	38,71	45,99	36,30
3	36,72	43,80	34,58	3	38,76	46,04	36,34
2	36,77	43,86	34,62	2	38,81	46,10	36,39
1	36,83	43,92	34,67	1	38,86	46,15	36,43
0	36,88	43,97	34,71	0	38,92	46,21	36,47
<b>0,9429</b>	36,93	44,03	34,76	<b>0,9389</b>	38,97	46,26	36,52
8	36,98	44,09	34,80	8	39,02	46,32	36,56
7	37,03	44,15	34,85	7	39,07	46,37	36,60
6	37,09	44,21	34,89	6	39,12	46,43	36,64
5	37,14	44,26	34,94	5	39,17	46,48	36,69
4	37,19	44,32	34,98	4	39,22	46,54	36,73
3	37,24	44,37	35,03	3	39,27	46,59	36,80
2	37,29	44,43	35,07	2	39,32	46,64	36,81
1	37,34	44,48	35,12	1	39,37	46,70	36,86
0	37,39	44,54	35,16	0	39,42	46,75	36,90
<b>0,9419</b>	37,44	44,60	35,20	<b>0,9379</b>	39,47	46,80	36,94
8	37,49	44,65	35,25	8	39,52	46,86	36,98
7	37,54	44,71	35,29	7	39,57	46,91	37,03
6	37,59	44,76	35,34	6	39,62	46,97	37,05
5	37,65	44,82	35,38	5	39,66	47,02	37,11
4	37,70	44,88	35,42	4	39,71	47,07	37,15
3	37,75	44,93	35,46	3	39,76	47,13	37,20
2	37,80	44,99	35,50	2	39,81	47,18	37,24
1	37,85	45,04	35,55	1	39,86	47,23	37,28
0	37,90	45,10	35,60	0	39,91	47,29	37,32
<b>0,9409</b>	37,95	45,15	35,65	<b>0,9369</b>	39,96	47,34	37,37
8	38,00	45,21	35,69	8	40,01	47,40	37,41
7	38,05	45,27	35,73	7	40,06	47,45	37,45
6	38,10	45,32	35,78	6	40,10	47,50	37,49
5	38,15	45,38	35,82	5	40,15	47,56	37,53
4	38,20	45,43	35,86	4	40,20	47,61	37,58
3	38,25	45,49	35,91	3	40,25	47,66	37,62
2	38,30	45,54	35,95	2	40,30	47,71	37,66
1	38,35	45,60	35,99	1	40,35	47,77	37,70
0	38,40	45,65	36,04	0	40,40	47,82	37,74

$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>
0,9359	40,45	47,87	37,79	0,9319	42,39	49,95	39,43
8	40,49	47,92	37,83	8	42,43	50,00	39,47
7	40,54	47,98	37,87	7	42,48	50,05	39,51
6	40,59	48,03	37,91	6	42,53	50,11	39,56
5	40,64	48,08	37,95	5	42,58	50,16	39,60
4	40,69	48,13	38,00	4	42,63	50,21	39,64
3	40,74	48,19	38,04	3	42,68	50,26	39,68
2	40,79	48,24	38,08	2	42,72	50,31	39,72
1	40,84	48,29	38,12	1	42,77	50,36	39,76
0	40,89	48,34	38,16	0	42,82	50,41	39,80
0,9349	40,94	48,40	38,21	0,9309	42,87	50,47	39,84
8	40,99	48,45	38,25	8	42,92	50,52	39,88
7	41,03	48,50	38,29	7	42,97	50,57	39,92
6	41,08	48,55	38,33	6	43,01	50,62	39,96
5	41,13	48,60	38,37	5	43,06	50,67	40,00
4	41,18	48,66	38,41	4	43,11	50,72	40,04
3	41,23	48,71	38,45	3	43,15	50,77	40,08
2	41,27	48,76	38,50	2	43,20	50,82	40,12
1	41,32	48,81	38,54	1	43,25	50,87	40,16
0	41,37	48,86	38,58	0	43,30	50,92	40,20
0,9339	41,42	48,92	38,62	0,9299	43,34	50,97	40,24
8	41,47	48,97	38,66	8	43,39	51,02	40,28
7	41,52	49,02	38,70	7	43,44	51,07	40,32
6	41,56	49,07	38,74	6	43,49	51,12	40,36
5	41,61	49,12	38,78	5	43,54	51,18	40,40
4	41,66	49,18	38,82	4	43,59	51,23	40,44
3	41,71	49,23	38,86	3	43,64	51,28	40,48
2	41,76	49,28	38,91	2	43,68	51,33	40,52
1	41,80	49,33	38,95	1	43,73	51,38	40,56
0	41,85	49,38	38,99	0	43,78	51,43	40,60
0,9329	41,90	49,44	39,03	0,9289	43,82	51,48	40,64
8	41,95	49,49	39,07	8	43,87	51,53	40,68
7	42,00	49,54	39,11	7	43,92	51,58	40,72
6	42,05	49,59	39,15	6	43,97	51,63	40,76
5	42,09	49,64	39,19	5	44,01	51,68	40,80
4	42,14	49,69	39,23	4	44,06	51,73	40,84
3	42,19	49,75	39,27	3	44,11	51,78	40,88
2	42,24	49,80	39,31	2	44,16	51,83	40,92
1	42,29	49,85	39,35	1	44,20	51,88	40,96
0	42,34	49,90	39,39	0	44,25	51,93	40,99



$\rho$	Etanol			$\rho$	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>		%	zapreminski %	g u 100 cm <sup>3</sup>
0,9279	44,30	51,98	41,03	0,9239	46,15	53,92	42,56
8	44,35	52,03	41,07	8	46,20	53,97	42,60
7	44,39	52,08	41,11	7	46,24	54,02	42,64
6	44,44	52,13	41,15	6	46,29	54,07	42,68
5	44,49	52,18	41,19	5	46,33	54,11	42,71
4	44,53	52,23	41,23	4	46,38	54,16	42,75
3	44,57	52,27	41,26	3	46,43	54,21	42,79
2	44,62	52,32	41,30	2	46,47	54,26	42,83
1	44,67	52,37	41,34	1	46,52	54,31	42,87
0	44,71	52,42	41,38	0	46,56	54,35	42,90
0,9269	44,76	52,47	41,42	0,9229	46,61	54,40	42,94
8	44,81	52,52	41,46	8	46,66	54,45	42,98
7	44,86	52,57	41,50	7	46,71	54,50	43,02
6	44,91	52,62	41,54	6	46,75	54,54	43,05
5	44,95	52,67	41,57	5	46,80	54,59	43,09
4	45,00	52,72	41,61	4	46,84	54,64	43,13
3	45,05	52,77	41,65	3	46,89	54,69	43,17
2	45,10	52,82	41,69	2	46,93	54,73	43,20
1	45,14	52,87	41,73	1	46,98	54,78	43,24
0	45,18	52,91	41,76	0	47,03	54,83	43,28
0,9259	45,23	52,96	41,80	0,9219	47,07	54,88	43,32
8	45,28	53,01	41,84	8	47,11	54,92	43,35
7	45,32	53,06	41,88	7	47,16	54,97	43,39
6	45,37	53,11	41,92	6	47,21	55,02	43,43
5	45,41	53,15	41,95	5	47,26	55,07	43,47
4	45,46	53,20	41,99	4	47,30	55,11	43,50
3	45,51	53,25	42,03	3	47,34	55,16	43,54
2	45,56	53,30	42,07	2	47,39	55,21	43,58
1	45,60	53,35	42,11	1	47,44	55,26	43,62
0	45,65	53,40	42,15	0	47,48	55,30	43,65
0,9249	45,69	53,44	42,18	0,9209	47,53	55,35	43,69
8	45,74	53,49	42,22	8	47,58	55,40	43,73
7	45,78	53,54	42,26	7	47,62	55,44	43,76
6	45,83	53,59	42,30	6	47,66	55,49	43,80
5	45,88	53,64	42,34	5	47,71	55,54	43,84
4	45,92	53,68	42,37	4	47,76	55,59	43,88
3	45,97	53,73	42,41	3	47,80	55,63	43,91
2	46,01	53,78	42,45	2	47,85	55,68	43,95
1	46,06	53,83	42,49	1	47,89	55,73	43,99
0	46,11	53,88	42,53	0	47,94	55,78	44,03

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом:

**Производња биоетанола као алтернативног горива из кукуруза помоћу слободног и имобилисаног квасца *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus***

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 28.03.2014.



---

Прилог 2.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Производња биоетанола као алтернативног горива из кукуруза помоћу слободног и имобилисаног квасца *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus***

која је моје ауторско дело.

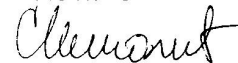
Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, 28.03.2014.