

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ОБРАЗАЦ 6.

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију 23.09.2011. године. Наставно-научно веће Технолошког факултета Универзитет у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <ul style="list-style-type: none">• др Радојка Размовски, редовни професор 17.10.1998., биотехнологија, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Србија, ментор.• др Синиша Марков, ванредни професор 07.12.2007., технолошка микробиологија, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Србија, председник,• др Љиљана Мојовић, редовни професор 15.07.2009., биохемијско инжењерство и биотехнологија, Технолошко-Металуршки факултет Београд, Универзитет у Београду, Србија, члан.
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: ВЕСНА (МИЛОРАДА) ВУЧУРОВИЋ, рођ. ВАСИЋ</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 30.04.1977, Зрењанин, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Технолошки факултет, Микробиолошки процеси, дипломирани инжењер технологије</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија -</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: Технолошки факултет Нови Сад, "Производња биоетанола из тритикалеа, пшенице и кукуруза", биотехнологија, 02.11.2007.</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: Биотехнологија</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
"Алкохолна ферментација меласе и густог сока шећерне репе помоћу имобилисаних ћелија <i>Saccharomyces cerevisiae</i>"

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикана и сл.

Физички опис дисертације:	Број поглавља:	7
	Број страна:	180
	Број литетатурних цитата:	193
	Број табела:	35
	Број слика:	68

Садржај рада:

1. **Увод** (од 1. до 5. стране);
2. **Теоријски део** (од 6. до 57. стране, 22 слике, 6 табела);
3. **Материјал и методи** (од 58. до 71. стране, 4 слике);
4. **Резултати и дискусија** (од 72. до 163. стране, 42 слике, 29 табела);
5. **Закључак** (од 164. до 168. стране);
6. **Литетатура** (од 169. до 180. стране)

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **УВОДУ** је дат кратак преглед потенцијала нашег поднебља за производњу биоетанола при чему је разматрана могућност примене међу- и нуспроизвода прераде шећерне репе као сировине за добијање етанола. Кандидат наводи да се у нашем региону меласа шећерне репе традиционално користи као сировина за производњу етанола. Меласа се може користити као хипертонични раствор за осмотску дехидратацију воћа и поврћа, након чега се такође може користити за производњу етанола. Поред меласе, за производњу етанола ферментацијом могу се користити и међупроизводи процеса прераде шећерне репе као што су екстракциони, ретки и густи сок. Увођење производње етанола у постојеће фабрике шећера представља атрактивну могућност за повећање профитабилности производње и уштеду енергије. Такође, у уводу су сагледани савремени правци развоја технологије етанола у које спада ферментација подлога са високим садржајем шећера (енгл. VHG), као и примена имобилисаних ћелија квасца. VHG ферментација подразумева припрему и ферментацију подлога које садрже више од 250 g/l шећера. Меласа и густи сок шећерне репе су високо концентровани раствори сахарозе који се могу користити за припрему подлога за VHG ферментацију. Иmobilизацијом се ћелије квасца хемијским или физичким путем причвршћују за површину чврстих носача. Иmobilисане ћелије квасца се као биокатализатори могу вишеструко користити у дисконтинуалним или континуалним поступцима ферментације при чему дуготрајно одржавају високу каталитичку активност. Две најчешће коришћене и најчешће изучаване методе за имobilизацију квасца у алкохолној ферментацији су адсорпција на површини различитих нерастворних материјала и умрежавање у матрици полимера. Избор методе и носача за имobilизацију има кључну улогу у економичности и ефикасности процеса производње етанола. У том смислу, јасно је дефинисан циљ истраживања.

Циљ истраживања ове дисертације је био да се испита и упореди алкохолна ферментација меласе и густог сока шећерне репе помоћу ћелија *Saccharomyces cerevisiae* имobilисаних на различитим носачима у стандардним (NG) и условима концентрације шећера (VHG), са крајњим циљем повећања ефикасности производње етанола. У оквиру рада квасац је имobilисан адсорпцијом на паренхимском ткиву стабла кукуруза (ПТСК) и резанцима шећерне репе (РШР), умрежавањем у Са-алгинату и новом комбинованом методом имobilизације која представља комбинацију адсорпције на ПТСК и умрежавања у Са-алгинату. Примена имobilисаних ћелија квасца на ПТСК, РШР и на комбинованим носачима од ПТСК и Са-алгината у алкохолној ферментацији није изучавана у досадашњим истраживањима, па стога претставља новину у технологији етанола.

У поглављу **ТЕОРИЈСКИ ДЕО** су систематски и детаљно описана сазнања о сировинама које се користе у производњи етанола, при чему је посебна пажња посвећена структури и хемијском саставу шећерне репе, односно хемијском саставу међу- и нуспроизвода технологије прераде ове културе са аспекта њихове примене као сировина у поступку добијања етанола. У наставку је дат преглед досадашњих сазнања из области алкохолне ферментације помоћу ћелија *S. cerevisiae*, са

посебним освртом на факторе који утичу на метаболизам квасца и кинетику ферментације. Затим су веома студиозно презентована објављена сазнања о методама имобилизације ћелија квасца на различитим носачима, о утицају имобилизације на физиологију и метаболизам ћелија квасца, о предностима примене имобилисаних ћелија квасца у алкохолној ферментацији и о биореакторима и ферментационим системима са имобилисаним ћелијама квасца. Посебна пажња је посвећена примени биљних материјала као носача за имобилизацију квасца у алкохолној ферментацији, при чему су наведени бројни цитати новијег датума, што указује на актуелност и оправданост примене ПРШР и ПТСК у ту сврху. На основу прегледа литературе кандидаткиња наводи да је полимер Са-алгинат један од најчешће коришћених носача за имобилизацију ћелија квасца у алкохолној ферментацији. Услед тога су исцрпно презентована литературна сазнања о структури и хемијском саставу полимера Са-алгината, поступцима имобилизације квасца у куглицама Са-алгината, карактеристикама ових куглица као и о алкохолној ферментацији помоћу ћелија квасца имобилисаних у Са-алгинату.

Кандидаткиња је детаљно и опширно обрадила доступна објављена сазнања у испитиваној области. На основу наведене и проучене литературе кандидаткиња је била у могућности да детаљно анализира и тумачи добијене резултате своје докторске дисертације као и да их упореди са резултатима других аутора.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ** детаљано су прво описани примењени материјали. За припрему подлога за ферментацију коришћени су меласа и густи сок шећерне репе, као и меласе које преостају након осмотске дехидратације црвеног купуса и мркве. Као производни микроорганизам коришћен је квасац *Saccharomyces cerevisiae*, а као материјали за имобилизацију коришћени су пресовани резанци шећерне репе-ПРШР, суви резанци шећерне репе-СРШР, паренхимско ткиво стабла кукуруза ПТСК (хбриди НС 444, НС 3014, НС 5043, НС 6010, НС 6030, НС 7016 и Gold Cup) и Са-алгинат. Затим је дат детаљан опис метода анализе физичко-хемијских, адсорпционих, структурних карактеристика ПРШР, СРШР и ПТСК као и оптичка и електронска микроскопија ових носача. У циљу квантификације имобилизационог потенцијала ових биљних носача дефинисани су параметри имобилизације као што су степен и ефикасност имобилизације, адсорпције и везивања квасца капиларним силама. У наставку су јасно описани поступци припреме квасца, начини припреме инокулума, односно поступци имобилизације квасца на ПРШР и СРШР, на ПТСК у облику цилиндара, у комбинованим цилиндрима од ПТСК и Са-алгината, у куглицама Са-алгината као и у комбинованим куглицама од Са-алгината и млива ПТСК. Описани су и поступци припреме хранљивих подлога, као и поступци дисконтинуалне и континуалне ферментације истих. Затим су описане примењене методе анализе сировина, ферментисаних подлога и добијених дестилата. У наставку је описан начин израчунавања параметара ферментације (степен конверзије шећера, продуктивност етанола, принос етанола на усвојени шећер, ефикасност ферментације) као и начини статистичке обраде података и прорачуна.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА** редослед приказаних резултата прати ток самог научног истраживања при чему су прегледно и јасно тумачени добијени резултати. У првом делу овог поглавља су анализирани физичко-хемијски параметри квалитета ПРШР, СРШР и ПТСК као што су: специфична маса млива, индекс адсорпције воде, садржај суве масе, садржај пепела, садржај азота и протеина по Kjeldahl-у. У циљу испитивања физичко-хемијске и механичке отпорности ових биљних материјала након хидратације у аутоклаву, утврђен је садржај воде, степен хидратације и степен упијања воде хидратисаних ПРШР, СРШР и ПТСК. У циљу утврђивања утицаја стерилизације у аутоклаву на евентуалну екстракцију компонената ПРШР, СРШР и ПТСК анализиран је садржај растворљивих соли, шећера и протеина као и рН вредност екстраката ових биљних материјала у води и у 10% етанолу. Резултати имобилизације ћелија квасца на ПРШР, СРШР и ПТСК обухватили су анализу горе наведених параметара имобилизације на основу којих је квантификован потенцијал имобилизације. Адсорпционе особине ПРШР, СРШР и ПТСК анализирани су адсорпцијом две катјонске (метиленско плаво и акридин оранж) и једне анијонске боје (ериохром црно Т), при чему су равнотежни подаци анализирани применом Freundlich-овог, Langmuir-овог и Temkin-овог модела адсорпционих изотерми. Том приликом утврђено је да ови

биљни материјали услед хетерогене хемијске структуре имају склоност да на различито наелектрисаним активним центрима адсорбују и катјоне и анијоне. Електронском и оптичком микроскопијом је потврђена имобилизација ћелија квасца како адсорпцијом на површини ПРШР, СРШР и ПТСК тако и везивањем капиларним силама у порама ових материјала. На основу физичко-хемијских, имобилизационих и адсорпционих карактеристика као и на основу микроскопске анализе структуре ПРШР, СРШР и ПТСК као најефикаснији носачи за имобилизацију квасца изабрани су СРШР и ПТСК хибрида Gold Cup и примењени у ферментационим експериментима.

Резултати анализе параметара квалитета меласе и густог сока обухватили су одређивање вредности рН, боје, садржаја суве масе, укупних шећера, сахарозе, протеина, азота, аминокиселина и пепела. На основу приказаних резултата утврђено је да меласа шећерне репе има изразито виши садржај нешећерних компоненти од густог сока.

У наставку су јасно и прегледно представљени резултати дисконтинуалне алкохолне ферментације подлога на бази меласе и/или густог сока применом ћелија квасца имобилизованих на ПРШР и СРШР, на ПТСК у облику цилиндара, у комбинованим цилиндрима ПТСК обложеним и пуњеним Са-алгинатом, у куглицама Са-алгината као и у комбинованим куглицама од Са-алгината и млива ПТСК као новим носачима. На основу анализе и дискусије резултата дисконтинуалне ферментације као најпогоднији носач изабране су комбиноване куглице од Са-алгината и млива ПТСК. Такође је утврђено да је у VHG условима концентрације шећера густо сок значајно боља сировина за алкохолну ферментацију од меласе. Узимајући у обзир претходно изведене закључке ћелије квасца имобилизоване на комбинованим куглицама од Са-алгината и млива ПТСК су примењене у вишестепеном и континуалном поступку VHG алкохолне ферментације густог сока шећерне репе. Статистичка обрада података је допринела доказивању сличности и разлика анализираних резултата. Дискусија је обухватила поређење и повезивање добијених резултата. Такође су у току дискусије остварени резултати коментарисани поређењем са бројним литературним подацима. Кандидаткиња је показала комплетно теоријско знање за објашњење добијених резултата у духу савремене науке у производњи етанола на основу којих је могла да изведе правилне закључке.

ЗАКЉУЧАК је изведен јасно и концизно на основу добијених резултата и одговара постављеном циљу докторске дисертације.

ЛИТЕРАТУРА даје јасан и прецизан приказ коришћених литературних навода. Већина литературних навода је новијег датума што указује на актуелност изучаване тематике.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

- **Vučurović V., Razmovski R.** Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products* 39 (2012) 128–134 (M21).
- **Razmovski R., Vučurović V.** Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel* 92 (2012) 1-8 (M21).
- **Razmovski R., Vučurović V.** Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology* 48 (2011) 378–385 (M 22).
- **Vučurović V., Razmovski R., Tekić M.** Methylene blue (cationic dye) adsorption onto sugar beet pulp: Equilibrium isotherm and kinetic studies. *Journal of the Taiwan Institute of*

Chemical Engineers 43 (2012) 108–111 (M22)

- **Vučurović V.**, Razmovski R., Rebić M. A corn stem as biomaterial for *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization for the ethanol production. Chemical Industry & Chemical Engineers Quarterly 14 (2008) 235-238 (M 24).
- **Vučurović V.**, Razmovski R., Popov S. Proizvodnja etanola pomoću ćelija *Saccharomyces cerevisiae* imobilisanih na parenhimskom tkivu stabljike kukuruza, usmeno izložen na naučnom skupu "Mikologija mikotoksikoze i mikoze" sa međunarodnim učešćem, Novi Sad, 2009., Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke, Matica Srpska Proceedings For Natural Sciences 116 (2009) 315-322, ISSN: 0352-4906. (M51).
- Razmovski R., **Vučurović V.**, Ethanol production from sugar beet molasses and thin juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, Proceedings: 1st International Congress: "Engineering, Materials and Management in the Processing Industry", University of east Sarajevo, October 14th-16th 2009, Jahorina, Republic of Srpska. (2009) 56-60. ISBN 987-99955625-2-6. (M 33).
- **Vučurović V.**, Razmovski P., Bekavac G., Bioethanol production from sugar beet thick juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on stem ground tissue of different maize hybrids. Proceedings: I International Congress: "Engineering, Materials and Management in the Processing Industry", University of east Sarajevo, october 14th-16th 2009, Jahorina, Republic of Srpska. (2009) 231-235. ISBN 987-99955625-2-6. (M 33).
- Razmovski R., **Vučurović V.**, Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on new combined maize stem ground-tissue carrier for ethanol production. VIII Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", 23-24 Oktobar 2009, Leskovac, Srbija, Zbornik radova tehnološkog fakulteta u Leskovcu, 19 (2009) 52-58, ISSN 0352-6542, UDK 004.007-3-5-6 (05). (M 63).
- **Vučurović V.**, Razmovski R., Bekavac G., Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue of different maize hybrids, VIII Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", 23-24 Oktobar 2009, Leskovac, Srbija, Zbornik radova tehnološkog fakulteta u Leskovcu 19 (2009) 59-66, ISSN 0352-6542, UDK 004.007-3-5-6 (05). (M 63).

VII ZAKLJUČCI ODNOSNO REZULTATI ISTRAŽIVANJA

- Пресовани резанци шећерне репе (ПРШР), суви резанци шећерне репе (СРШР) и паренхимско ткиво стабла кукуруза (ПТСК) хибрида НС 444, НС 3014, НС 5043, НС 6010, НС 6030, НС 7016 и Gold Cup су јефтини, широко распрострањени, стабилни, обновљиви, нетоксични и веома хидрофилни биоматеријали.
- Током стерилизације и хидратације у аутоклаву се не нарушавања физичка структура ПРШР, СРШР и ПТСК. ПТСК има већи капацитет везивања воде од ПРШР и СРШР, али је процес хидратације ПТСК значајно спорији. Приликом хидратације из једног грама ПТСК, у зависности од хибрида, у води се екстрахује 24,2-44,8 mg растворљивих соли и 2,7-106,3 mg шећера, 3,15-5,93 mg азота, односно 19,69-37,19 mg протеина. Садржај укупних растворљивих соли, пепела и шећера у ПТСК као и кисело-базни карактер ПТСК је карактеристика хибрида. ПРШР и СРШР садрже значајно мање количине растворљивих компоненти од ПТСК. Повећањем садржаја етанола, долази до интензивније екстракције појединих растворљивих материја из носача.
- ПРШР, СРШР и ПТСК имају како позитивно, тако и негативно наелектрисане функционалне групе, па стога представљају ефикасне адсорбенте и за катјоне и за ањјоне. Адсорпциони афинитет ПРШР, СРШР и ПТСК према катјонима се повећава повећањем рН вредности, а према ањјонима смањењем рН вредности. При вредности рН оптималним за ферментативну активност квасца (5,0-5,5) ПТСК има виши капацитет адсорпције ањјона него ПРШР и СРШР. ПТСК је стога ефикаснији адсорбент за имобилизацију ћелија квасца него СРШР, захваљујући привлачним електростатичким силама између негативно наелектрисане површине ћелија квасца и позитивно наелектрисаних активних центара носача.
- ПРШР, СРШР и ПТСК су јефтини, перспективни и високо ефикасни адсорбенти који се потенцијално могу применити у поступку прераде индустријских отпадних вода које

садрже токсичне и канцерогене катјонске и анијонске боје, а чије испуштање у водотокове може изазвати озбиљне еколошке проблеме.

- Захваљујући високој порозности ПРШР, СРШР и ПТСК је омогућена ефикасна имобилизација и умножавање имобилисаних ћелија квасца уз минимална ограничења интерног преноса масе супстрата и продуката кроз носач. Ћелије квасца се делом чврсто адсорбују физичко-хемијским интеракцијама на саму површину носача, а делом су везане капиларним силама у порозној структури носача. У условима турбулентног стујања супстрата ћелије везане капиларним силама могу бити испране са носача. Један део ћелија квасца је смештен испод саме површине носача на изразито позитивно наелектрисаним и механички флексибилним сегментима носача, који услед електростатичког афинитета прекривају ћелије.
- Захваљујући већој порозности, ПТСК има већу моћ везивања ћелија квасца капиларним силама од ПРШР и СРШР. СРШР имају више вредности степена адсорпције квасца (0,124 g/g), већу микробиолошку стабилност и једноставнији су за манипулацију у поређењу са ПРШР, па су стога коришћени као носач за имобилизацију квасца. Имобилизациони капацитет ПТСК не зависи значајно од хибрида. Од испитиваних хибрида ПТСК, као најпогоднији носач за имобилизацију квасца се показао хибрид Gold Cup услед највећег степена адсорпције квасца (0,131 g/g), највећег степена хидратације (28,04 g/g) и услед најмањег садржаја растворљивих шећера (2,7 mg/g). Имобилизација квасца на хидратисаним СРШР и ПТСК је јефтина и једноставна, омогућује одржавање велике густине ћелија квасца. У случају инфекције постоји могућност поновне стерилизације и употребе ових носача.
- Примењена меласа и густо сок шећерне репе су веома добре сировине за производњу етанола услед високог садржаја директно ферментабилних шећера и једноставне припреме. Са становишта производње етанола густо сок је боља сировина у поређењу са меласом, јер се из јединице масе густог сока може произвести већа количина етанола него из јединице масе меласе, при чему се остварује уштеда процесне воде и енергије у фази припреме подлоге, уштеда киселина за подешавање рН вредности подлоге.
- ПТСК се може користити као алтернативни обновљиви извор хранљивих материја неопходних квасцу током ферментације меласе и густог сока, а такође и као антипенушавац. Додатком млива ПТСК примењених хибрида у подлоге за ферментацију од меласе и густог сока скраћује се време ферментације и повећава принос етанола.
- Ћелије квасца имобилисане на хидратисаним СРШР се могу успешно применити за седам узастопних дисконтинуалних ферментација густог сока (100 и 120 g/l шећера) без опадања продуктивности процеса, док у случају ферментације меласе већ након треће ферментације долази до опадања продуктивности етанола. Повећањем садржаја шећера у подлози од меласе и густог сока са 150 на 180 g/l долази до повећања продуктивности етанола и опадања степена конверзије шећера, приноса етанола на усвојени шећер и ефикасности ферментације. Максимална продуктивност етанола 1,48 g/lh за меласу и 1,57 g/lh за густо сок остварена је при почетној концентрацији шећера у подлози 180 g/l. Имобилисани биокатализатор се може успешно применити за дисконтинуалну ферментацију подлога, али нема перспективу у вишестепеној дисконтинуалној и континуалној VHG ферментацији, услед тога што долази до интензивне адсорпције бојених и других нешећерних компоненти на површину хидратисаних СРШР. Адсорпција нешећерних компоненти на СРШР доводи до десорпције ћелија квасца и негативно утиче на метаболизам имобилисаних ћелија квасца, услед чега се остварују нижи параметри ферментације. Имобилизацијом квасца се резанаци шећерне репе обогаћују протенима и хранљивим материјама, па се искоришћени носач са имобилисаним квасцем потенцијално може употребити у сточној исхрани.
- Применом ћелија квасца имобилисаних на ПТСК у облику диска (висине око 5 mm и пречника око 20 mm) за ферментацију меласе и густог сока, почетне концентрације шећера 100 g/l, 150 g/l и 300 g/l, постигнута је продуктивност етанола 0,94 g/lh, 1,26 g/lh и 0,74 g/lh за меласу и 0,94 g/lh 1,42 g/lh и 1,10 g/lh за густо сок. Током VHG ферментације меласе, ћелије квасца су изложене стресу услед високе концентрације шећера и високе концентрације нешећерних материја. Продуктивност етанола у овим условима је нижа у односу на густо сок. Ћелије квасца имобилисане на ПТСК се могу успешно применити за

ферментацију меласе и густог сока. Међутим, услед високог степена порозности ПТСК на крају ферментације меласе и густог сока са носача се испере више од 50% имобилисаних ћелија квасца, што представља основни недостатак примене овог носача.

- У циљу повећања степена имобилизације квасца (R_f), ефикасности имобилизације квасца (Y_f), стабилности носача и спречавања десорпције и испирања ћелија квасца са ПТСК примењена су два различита поступка имобилизације квасца комбиновањем природне адсорпције на диску ПТСК и умрежавања у матрици Са-алгината. Првом методом припремљен је комбиновани носач у облику диска ПТСК који је обложен слојем Са-алгината (K1), а другом носач у облику диска ПТСК који је испуњен Са-алгинатом (K2). Применом носача K1 у ферментацији долази до постепеног одвајања и пуцања танког слоја Са-alginata формираног око ПТСК диска услед издвајања CO_2 , па стога овај носач није адекватан за повећање ефикасности имобилизације ћелија квасца на ПТСК. Применом квасца имобилисаног на и у носачу K2 за ферментацију густог сока почетне концентрације шећера 150 g/l остварена је продуктивност етанола 1,47 g/lh. Током ферментације долази до повећања степена имобилизације што је последица умножавања имобилисаних ћелија квасца, које у овом случају у великој мери (72%) остају задржане у структури носача K2. Иmobилизацијом квасца на и у носачу K2 је спречено интензивно испирање ћелија квасца са ПТСК, повећан је степен имобилизације као и механичка стабилност носача. Међутим, услед велике запремине и компактности носача K2 транспорт супстрата и продуката кроз диск је отежан.
- Применом ћелија квасца имобилисаних умрежавањем у куглицама Са-алгината за ферментацију меласе и густог сока, почетне концентрације шећера 100-300 g/l, услед издвајања CO_2 током ферментације долази до нарушавања структуре куглица појавом попречне пукотине која куглицу полимера дели на два приближно једнака дела. При почетној концентрацији шећера у подлози изнад 200 g/l густој соку је боља сировина за производњу етанола од меласе. У ферментационој систему са имобилисаним ћелијама квасца у куглицама Са-алгината ферментацијом меласе постигнута је максимална концентрација етанола 86,4 g/l при почетној концентрацији шећера 200 g/l. Ферментацијом густог сока постигнута је максимална концентрација етанола 109,0 g/l при почетној концентрацији шећера 250 g/l. У испитиваним ферментационим системима највиша продуктивност етанола од 1,20 g/lh може се постићи алкохолном ферментацијом меласе применом ћелија квасца имобилисаних у куглицама Са-alginata при оптималној концентрацији шећера у подлози од 130 g/l.
- Меласе након осмотске дехидратације црвеног купуса (M1) и мркве (M2) имају виши садржај воде од полазне меласе (M0), па самим тим и нижи вискозитет, чиме је омогућена уштеда воде за припрему подлоге за ферментацију, али и енергије потребне за мешање подлоге и растварање меласе. Осмотском дехидратацијом црвеног купуса и мркве услед дифузије компоненти из поврха у меласу и обрнуто смањује се садржај укупних шећера, повећава се садржај минералних материја и растворљивих соли, док се садржај азотних једињења не мења значајно. Меласе након осмотске дехидратације црвеног купуса и мркве су веома добре сировине за производњу етанола при почетној концентрацији шећера у подлози до 150 g/l, али нису погодне сировине за ферментацију подлога са вишим садржајем шећера. Поједине компоненте из црвеног купуса и мркве при ниским концентрацијама шећера имају стимулативно дејство на ћелије квасца, док при концентрацији шећера у подлози 175 g/l делују инхибиторно на ћелије квасца. Инхибиторно дејство је мање изражено у ферментационој систему са ћелијама имобилисаним у куглицама Са-alginata. Највише продуктивности етанола за меласу M0 (1,18 g/lh), M1 (1,24 g/lh) и M2 (1,30 g/lh) остварене су применом имобилисаних ћелија квасца у куглицама Са-алгината за ферментацију подлога са почетним садржајем шећера 125 g/l.
- У циљу повећања порозности куглица Са-алгината (АБ) развијен је нови носач за имобилизацију квасца у виду комбинованих куглица од Са-алгината и млива ПТСК (АБЦ). У АБЦ куглицама су ћелије квасца делом адсорбоване на површини ПТСК а делом су умрежене у Са-алгинату. Услед веће порозности кроз АБЦ куглицу је омогућен ефикаснији пренос масе супстрата и продуката, у поређењу са АБ куглицама, али такође долази до бржег испирања квасца. Ферментацијом меласе почетне концентрације 130 g/l шећера, применом квасца имобилисаног на комбинованом носачу АБЦ након 24 х ферментације је

остварена средња вредност концентрације и продуктивности етанола (60,36 g/l и 2,51 g/lh) Ниже вредности су остварене у поступку са применом носача АБ (57,12 g/l и 2,38 g/lh) и у поступку са суплементацијом ПТСК у подлогу за ферментацију АБ+Ц (58,94 g/l и 2,46 g/lh). Имобилицане ћелије квасца у АБ и АБЦ куглицама су ефикаснији биокатализатори за ферментацију меласе од слободних ћелија, што је последица заштитног дејства носача на квасац. Комбиновани носач у виду куглица од Са-алгината и млива ПТСК (АБЦ) обједињује предности адсорпције ћелија на нерастворни носач (ПТСК) и умрежавања у полимеру Са-алгината. За разлику од АБ куглица, услед олакшаног издвајања CO₂, током ферментације не долази до нарушавања структуре или пуцања АБЦ куглица.

- Додатком мива ПТСК у подлогу или у Са-алгинат повећава се садржај етанола и метанола, а смањује се садржај киселина и ацеталдехида у свежем сировом дестилату. Додатак ПТСК у подлогу за ферментацију или носач за имобилизацију није имао значајног утицаја на садржај естара, виших алкохола и фурфурала у дестилатима.
- Имобилицане ћелије квасца на комбинованим куглицама од Са-алгината и млива ПТСК (АБЦ) се могу вишеструко успешно користити у поновљеним дисконтинуалним ферментацијама густог сока у стандардним и VHG условима концентрације шећера. Током пет циклуса ферментације не долази до задржавања CO₂ у носачу и нарушавања структуре носача, као ни до издвајања пене током ферментације. Након ферментације густог сока са високим садржајем шећера (275 g/l и 300 g/l) у поновљеним циклусима ферментације у подлогама преостане 34,8-50,7 г/л шећера, што представља својеврсни губитак са становишта производње етанола. Ћелије квасца имобилицане на комбинованим АБЦ куглицама задржавају подједнако добру способност производње етанола и из густог сока у периоду од десет дана. При почетној концентрацији шећера 200 g/l, 225 g/l, 250 g/l, 275 g/l и 300 g/l у пет поновљених циклуса ферментације остварене су средње вредности концентрације етанола 92,4-98,7 g/l, 98,4-107,6 g/l, 101,6-110,3 g/l, 107,1-110,2 g/l и 106,5-109,4 g/l. Продуктивност етанола у свих пет поновљених циклуса ферментације густог сока је била у опсегу 1,92-2,30 g/lh.
- Континуална VHG ферментација густог сока почетне концентрације шећера 300 g/l, у биореактору са имобилисаним квасцем у комбинованим куглицама од Са-алгината и млива ПТСК (АБЦ) је успешно изведена у трајању од 15 дана. При брзинама разблажења 0,028 h⁻¹, 0,023 h⁻¹ и 0,019 h⁻¹ усвојено је највише 74,46%, 87,23% и 86,54% шећера из подлоге, при чему су концентрације етанола су износиле 103,6 g/l, 112,7 g/l и 112,4 g/l. Волуметријска продуктивност етанола је била у опсегу 3,29-4,66 g/lh. Смањењем брзине разблажења са 0,028 h⁻¹ на 0,019 h⁻¹ смањује се доток шећера и раствореног кисеоника у биореактор, па специфична ћелијска продуктивност етанола опада са 0,17 g/gh на 0,12 g/gh. У циљу повећања продуктивности етанола током континуалне ферментације може се препоручити повремено увођење мале количине ваздуха у биореактор.

VIII ОСЕНА НАЧИННА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Резултати су, графички и табеларно, јасно и прегледно приказани. Приказ резултата је подељен у стручно конципиране, делове који, сваки за себе, представља целину из које произилазе одговарајући закључци. Резултати су дискутовани са технолошког и статистичког аспекта. Тумачење резултата је студиозно и детаљно уз поређење са резултатима објављеним у области добијања етанола ферментацијом под сличним условима и може се **позитивно оценити**.

IX КОНАЧНА ОСЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАСИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Докторска дисертација је у потпуности урађена и написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе укључујући:

- детаљан приказ утврђених ставова у научној области која је предмет истраживања,
- оригиналан приступ и правилно описан експериментални рад,
- коректно приказане и дискутоване резултате и
- правилно изведене закључке.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Оригиналан допринос ове докторске дисертације се огледа у примени ћелија *S. cerevisiae* имобилисаних на новим, до сада не изучаваним носачима за алкохолну ферментацију меласе и густог сока шећерне репе при стандардним условима концентрације шећера (NG) и у условима високе концентрације шећера (VHG). У раду је по први пут промовисана алкохолна ферментација меласе преостале након ферментације мркве и купуса помоћу имобилисаних ћелија квасца.

Резанци шећерне репе (РШР), паренхимско ткиво стабла кукуруза (ПТСК) у облику диска, ПТСК диск обложен Са-алгинатом (К1) и пуњен Са-алгинатом (К2) као и комбиноване куглице од Са-алгината и млива ПТСК (АБЦ) су по први пут примењени и промовисани као носачи за имобилизацију ћелија квасца у алкохолној ферментацији.

Примена резанаца шећерне репе (РШР) и паренхимског ткива стабла кукуруза (ПТСК) као јефтиних и обновљивих, биљних носача за имобилизацију ћелија квасца у алкохолној ферментацији меласе и густог сока доприноси повећању ефикасности процеса производње етанола. У раду је установљено да се ПТСК може користити као алтернативни извор хранљивих материја неопходних квасцу током ферментације, а такође и као антипенушавац уместо скувих комерцијалних препарата. Такође је установљено да се РШР и ПТСК, захваљујући хетерогеној структури, могу користити као јефтине, и високо ефикасни адсорбенти за уклањање токсичних и канцерогених катјонских и анјонских боја из водених раствора.

Носач у облику диска ПТСК који је обложен Са-алгинатом се не препоручује за имобилизацију квасца у алкохолној ферментацији услед механичке нестабилности слоја Са-алгината. Применом диска ПТСК пуњеног Са-алгинатом (К2) у алкохолној ферментацији спречава се интензивно испирање ћелија квасца са носача али се успорава транспорт супстрата и продуката ферментације кроз носач.

Применом новог комбинованог носача у облику куглица од Са-алгината и млива ПТСК обједињене су предности две методе имобилизације, адсорпције ћелија квасца на површини нерастворног носача (ПТСК) и умрежавања у Са-алгинату. Додатком млива ПТСК у Са-алгинат повећана је стабилност и порозност куглица гела и олакшан је транспорт супстрата и

продуката ферментације кроз полимер. Ћелије квасца имобилисане на овом комбинованом носачу могу се дуготрајно користити за вишестепену дисконтинуалну и континуалну VHC ферментацију густог сока шећерне репе.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Комисија са задовољством констатује да је докторска дисертација кандидата мр Весне Вучуровић, под насловом "Алкохолна ферментација меласе и густог сока шећерне репе помоћу имобилисаних ћелија *Saccharomyces cerevisiae*" у потпуности остварила постављене циљеве истраживања. Аналитички приступ проблему, изузетно познавање како теоријских поставки тако и експерименталних техника, примена савремених метода и детаљан увид у друга сазнања објављена у литератури су одлике овог рада. На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.

У Новом Саду, 22.04.2012.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ