

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Marko Božinović

Renata Vičević

Nikolina Zekić

Proizvodnja bioetanolu iz enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog tropa

Zagreb, lipanj 2022.

Ovaj rad smo izradili samostalno u laboratoriju Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Anite Šalić. Rad je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

Nomenklatura

Simboli

c	množinska koncentracija [mol/L]
E	učinkovitost [%]
k	brzina kemijske reakcije [g/(L·h)]
K_s	konstanta zasićenja supstratom [g/L]
m	masa [g]
Pr	produktivnost [g/(L·h)]
t	vrijeme provedbe reakcije[h]
Y_P	prinos produkta [g/L]
$Y_{P/S}$	koeficijent iskorištenja produkta na supstratu [g/g]
$Y_{X/S}$	koeficijent iskorištenja biomase na supstratu [g/g]
q	volumni protok [L/h]

Grčki simboli

γ	masena koncentracija [g/L]
λ	valna duljina [nm]
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta biomase [1/h]

Kratice

ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
E	etanol
GC	plinski kromatograf
GOD	enzim glukoza-oksidaža
kon	konačna
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NAD ⁺	oksidirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NADH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
P	produkt
PAP	4-amino-fenazonom
Pi	anorganski fosfat
poč	početna
S	supstrat
UPLC	kapljevinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

X biomasa

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2. 1. Bioetanol.....	2
2. 1. 1. Svojstva bioetanola	3
2. 1. 2. Primjena bioetanola	4
2. 1. 3. Ekološka važnost bioetanola.....	6
2. 2. Lignocelulozna biomasa	6
2. 2. 1. Pivski trop	8
2. 3. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina	8
2. 3. 1. Priprema sirovine	8
2. 3. 2. Hidroliza	9
2. 3. 2. 1. Hidroliza razrijeđenom kiselinom.....	9
2. 3. 2. 2. Hidroliza koncentriranom kiselinom	9
2. 3. 2. 3. Enzimaska hidroliza.....	10
2. 3. 3. Fermentacija.....	10
2. 3. 3. 1. Kvasci odgovorni za fermentaciju bioetanola.....	12
2. 3. 3. 1. 2. Ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci (nekonvencionalni kvasci)	13
3. Eksperimentalni dio	15
3. 1. Materijali.....	15
3. 1. 1. Kemikalije.....	15
3. 1. 2. Oprema.....	16
3. 2. Metode	17
3. 2. 1. Priprema reakcijskog pufera	17
3. 2. 2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih šećera	17
3. 2. 2. 1. Priprema DNS reagensa.....	17
3. 2. 2. 2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih šećera.....	17
3. 2. 3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze	18
3. 2. 3. 1. Priprema radnog reagensa za određivanje koncentracije glukoze	18
3. 2. 4. Određivanje sastava lignoceluloznog materijala nakon hidrolize	19
3. 2. 5. Određivanje koncentracije etanola.....	19
3. 2. 6. Određivanje koncentracije kvasaca.....	20
3. 2. 7. Fermentacija s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL.....	20

3. 2. 8. Fermentacija s permeabiliziranim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL.	20
3. 2. 9. Fermentacija s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 250$ mL	21
3. 2. 10. Fermentacija s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata	21
3. 2. 11. Provedba procesa fermentacije korištenjem enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog troja	23
3. 2. 11. 1. Enzimska hidroliza pivskog troja	23
3. 2. 11. 2. Kiselinska hidroliza pivskog troja	24
3. 2. 11. 3. Fermentacija hidrolizata pivskog troja	24
3. 2. 12. Određivanje uspješnosti bioprocesa	24
3. 2. 13. Matematički model procesa proizvodnje bioetanol – reaktorski i kinetički modeli	25
3. 2. 13. 1. Šaržni reaktor	25
3. 2. 13. 2. Šaržni reaktor s dotokom	26
3. 2. 14. Ghose-Tyagi-ova modifikacija jednadžbe Monodove kinetike za opis procesa alkoholne fermentacije	27
3. 2. 15. Obrada podataka	27
4. Rezultati i rasprava	29
4. 1. Fermentacija modelne otopine glukoze s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL	29
4. 2. Fermentacija glukoze s permeabiliziranim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL	32
4. 3. Ispitivanje utjecaja početne koncentracije glukoze na produktivnost procesa	35
4. 4. Šaržna fermentacija s dotokom supstrata	39
4. 5. Šaržna fermentacija na hidrolizatu pivskog troja	42
5. Zaključak	46
6. Zahvale	47
7. Literatura	48
8. Prilozi	52
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih šećera	52
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze	53
Prilog 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije tvari u prisutnih lignoceluloznoj sirovini	54
Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola	55
Prilog 5. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje brzine kemijske reakcije (k)	56

Prilog 6. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje parametara Ghose-Tyagi-ova modifikacije Monodove kinetike	57
Prilog 7. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST matematičkog modela procesa provedenog u reaktoru s dotokom.....	58
Prilog 8. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST matematičkog modela procesa provedenog s hidrolizatom pivskog tropa.....	60
Prilog 9. Kromatogrami GC analize uzoraka prikupljenih u različitim vremenima fermentacije provedenom s hidrolizatom pivskog tropa tretiranog s NaOH	61
Sažetak	62
Summary	63
Životopisi	64

1. Uvod

Ubrzana eksploatacija fosilnih goriva, nestabilnost tržišta, kao i negativan utjecaj na okoliš samo su neki od razloga zašto Protokol iz Kyota [1] i najnoviji Pariški protokoli [2] pozivaju na korištenje čistih, „zelenih” i obnovljivih izvora energije. Biogoriva se smatraju prihvatljivom alternativom fosilnim gorivima čijim korištenjem se smanjuje emisija ugljikova dioksida, mnoge zemlje postaju neovisne o velikim proizvođačima fosilnih goriva, a cijene energenata se stabiliziraju što je u današnje vrijeme od iznimnog značenja [3].

Bioetanol je uz biodizel jedno od najčešće korištenih biogoriva na svijetu. Dobiva se procesom fermentacije, a može se proizvesti iz različitih sirovina kao što su šećeri (šećerna trska i šećerna repa), škrob (kukuruz, pšenica, raž, ječam i krumpir), lignoceluloza (trava, slama, drvo itd.) te biomasa algi [4]. Iako proces još nije komercijaliziran u potpunosti, smatra se da će lignocelulozna biomasa biti jedna od osnovnih sirovina za proizvodnju biogoriva u budućnosti, a posebice bioetanola [5]. Razlog tome je što je lignocelulozna biomasa obnovljiva i lako dostupna, jeftina i prisutna u velikim količinama, a za razliku od ostalih sirovina koje se koriste za proizvodnju biogoriva, ne može se koristiti za ljudsku prehranu te na taj način sadnja usjeva za proizvodnju biogoriva ne konkuriše prehrambenim usjevima. Zbog svega toga se sve više proučava proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloze [6].

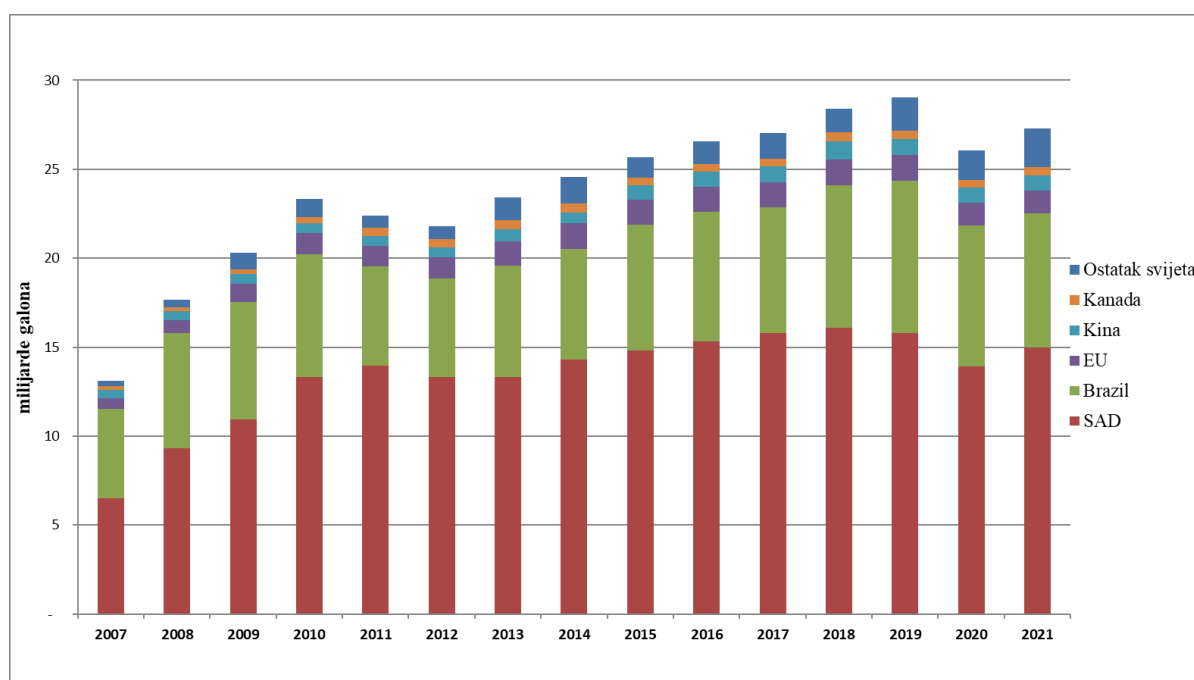
Industrijska proizvodnja bioetanola provodi se najčešće pomoću kvasca iz roda *Saccharomyces* [5]. Stoga je prvi cilj ovog istraživanja usporediti različite vrste kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *Bayanus*, *Saccharomyces pastorianus* i *Saccharomyces cerevisiae diastaticus*) kako bi se odabrao kvasac koji će tijekom provedbe procesa dati najveći prinos na bioetanolu. Prvi dio istraživanja proveden je korištenjem modelne otopine glukoze različitih koncentracija (5, 10 i 50 g/L glukoze) u dvije različite vrste reaktora, šaržnom i šaržnom reaktoru s dotokom. Nakon što su određeni optimalni uvjeti provedbe procesa, proizvodnja bioetanola provedena je korištenjem enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog tropa uz kvasac koji je dao najveći prinos na bioetanolu.

2. Teorijski dio

2. 1. Bioetanol

Smanjenje rezervi fosilnih goriva, konstantni rast cijena energenata i značajan negativan utjecaj na okoliš kao posljedica korištenja fosilnih goriva osnovni su razlozi zbog kojih se sve više istražuju i razvijaju procesi proizvodnje ekološki prihvatljivih goriva. Biogoriva proizvedena iz obnovljivih izvora se smatraju prihvatljivom alternativom fosilnim gorivima. Korištenjem biogoriva smanjuje se emisija CO₂ i drugih stakleničkih plinova, brojne zemlje postaju energetske neovisne uz istovremen rast gospodarstva i stvaranje dodane vrijednosti. Danas su najveći proizvođač biogoriva Sjedinjene Američke Države [3].

Strateški cilj Europske unije (EU), pa tako i Republike Hrvatske, je povećati proizvodnju biogoriva u nadolazećem periodu. Biogorivima s najviše potencijala smatraju se bioetanol, bioplina i biodizel, a na Slici 1. prikazana je svjetska proizvodnja bioetanola u razdoblju 2007. – 2021. godine.



Slika 1. Svjetska proizvodnja bioetanola [7]

Bioetanol je alkohol dobiven fermentacijom ugljikohidrata. Najčešće se proizvodi iz sirovina na bazi šećera ili škroba, a tako dobiveni bioetanol se naziva bioetanolom prve generacije [8]. Proizvodnja bioetanola na bazi šećera jednostavnija je od proizvodnje na bazi škroba pa se i češće primjenjuje. Najčešće šećerne sirovine koje se koriste u proizvodnji bioetanola su šećerna repa i šećerna trska. Kako se šećerna repa koristi za proizvodnju

konzumnog šećera, nije preporučljiva njena upotreba u proizvodnji bioetanolu. S druge strane, nusproizvodi koji nastaju tijekom proizvodnje šećera, kao što su melasa, repini rezanci, rijetki i gusti šećerni sok, imaju značajan potencijal u proizvodnji bioetanolu [9]. Od škrobnih sirovina najzastupljeniji su kukuruz (SAD), pšenica, raž, ječam i krumpir (EU). Kako bi se škrob kao sirovina mogao koristiti za proizvodnju bioetanolu, mora se prvo hidrolizirati do jednostavnijih šećera što se najčešće provodi obradom pomoću hidrolitičkih enzima (npr. amilaza, glukoamilaza itd.) ili kiselina i lužina. Na taj način dobiveni hidrolizat koji je u osnovi vodena otopina nižih šećera se lako fermentira u bioetanol pomoću kvasaca kao što su primjerice oni iz roda *Saccharomyces*. S obzirom da se sirovine na bazi šećera i škroba primarno koriste kao hrana, njihova upotrebom za proizvodnju biogoriva rezultira nepredvidivim promjenama u cijeni prehrambenih proizvoda te se stvara konkurencija pri korištenju usjeva za prehrambene svrhe ili kao biogoriva. Zbog toga se sve više traga za alternativnim sirovinama za proizvodnju biogoriva. Tako se pri proizvodnji bioetanolu kao alternativa sve se više koristi lignocelulozna biomasa (bioetanol druge generacije) te biomasa mikroorganizama i algi (bioetanol treće generacije) [10]. Alternativno, bioetanol se može dobiti i iz CO₂ korištenjem naprednih tehnologija kao što su elektrokemijska sinteza, elektroliza oksida i hidrobrada nafte [11], a tako dobiveni bioetanol nazivamo bioetanolom četvrte generacije.

2. 1. 1. Svojstva bioetanolu

Bioetanol u čistom obliku je bezbojna bistra tekućina s blagim karakterističnim mirisom. Temperatura vrelišta mu je 78 °C, a temperaturom ledišta – 112 °C [8]. Ostala karakteristična svojstva bioetanolu su: visoka toplina isparavanja, niska temperatura plamena, veća promjena volumena plina, visoka specifična energija, niska toksičnost i visoki oktanski broj u odnosu na benzin. Navedena svojstva omogućuju postizanje oko 15% veće učinkovitosti kompresije i kraće vrijeme izgaranja u odnosu na benzin što bioetanol čini povoljnim za korištenje kao čisto gorivo u motorima s unutarnjim izgaranjem [10].

Nedostatci bioetanolu su korozijsko djelovanje na motor te na spremnik goriva. Bioetanol odlikuju manji tlak para i higroskopsnost u odnosu na benzin. Osim toga, energetska vrijednost bioetanolu u odnosu na benzin je manja pri čemu je s obzirom na ovaj pokazatelj 1 L benzina ekvivalent 1,2 – 1,5 L bioetanolu što znači da je po prijeđenom kilometru potrošnja bioetanolu veća u odnosu na potrošnju benzina [9].

2. 1. 2. Primjena bioetanola

Danas se bioetanol kao gorivo koristi u nekoliko zemalja, a među najvećim potrošačima su Brazil, Sjedinjene Američke Države, ali i neke europske zemlje poput Švedske [13].

Kada se koristi u čistom obliku (E100, odnosno 100% etanol s ili bez aditiva), bioetanol teško isparava pri niskim temperaturama pa je motore vozila koja koriste E100 teško pokrenuti pri niskim temperaturama [14]. Iz tog se razloga etanol miješa s benzinom u različitim omjerima, npr. E85 (85% etanola i 15% benzina), a takvo gorivo naziva se gashol. Druga mogućnost je miješanje etanola s dizelom pri čemu nastaje tzv. oksid-dizel koji je obično mješavina 80% dizel goriva, 10% etanola te 10% aditiva i sredstava za miješanje [8]. Mješavine bioetanola do E10 već se mogu koristiti u većini konvencionalnih benzinskih motora bez potrebe za njihovim izmjenama, a takvo gorivo čak može i poboljšati performanse motora. U Tablici 1. prikazan je pregled različitih vrsta bioetanola s obzirom na udio u smjesama s benzinom te njihova uporaba.

Tablica 1. Čisti i miješani bioetanol kao gorivo i njegova upotreba u različitim zemljama [12]

Čisto/miješano biogorivo	Opis	Upotreba	Zemlje
ETBE	<15% v/v mješavina u benzinu	Svi benzinski motori	Španjolska, Italija, Njemačka, Francuska
E5	5% v/v etanol u benzinu		Nije specificirano
E10	10% v/v etanol u benzinu	Svi benzinski motori u SAD-u	Švedska, Kanada, SAD, Brazil
E22	22% v/v etanol u benzinu	Svi benzinski motori u Brazilu	Brazil
E85	85% v/v etanol u benzinu	Motori na fleksibilno gorivo	Brazil, SAD, Švedska
E95	95% v/v etanol u benzinu	Motori na prirodni plin	Švedska, Brazil
E100	100% etanol		
EtOH u dizelu + aditivi	<15% v/v etanol u dizelu	Dizelski motori	Švedska, SAD

Iako se bioetanol uglavnom koristi kao gorivo ili dodatak gorivu u motornim vozilima, može se koristiti i kao sirovina i izvor energije u kemijskoj industriji. Budući da se više od 95% kemikalija koje sadrže ugljik proizvodi iz fosilnih izvora, jedina racionalna alternativa za njihovu proizvodnju je uporaba biomase odnosno kemikalija koje se dobivaju iz biomase kao što je bioetanol. Primjenom bioetanola u kemijskoj industriji dobivaju se produkti čija je vrijednost veća nego što je to ona transportnog goriva. Tako se u kemijskoj industriji bioetanol može koristiti u proizvodnji vodika (kao goriva ili aditiva za gorivo), acetaldehida, etilena, butadiena i octene kiseline [15].

Bioetanol se također može koristiti u proizvodnji bioplastike. Dehidracijom bioetanola na visokim temperaturama uz primjenu čvrstog katalizatora dolazi do nastanka etilena, koji se koristi kao monomer u proizvodnji „zelenog” polietilena [16].

2. 1. 3. Ekološka važnost bioetanola

Kao što je već spomenuto, pronalaženje alternativnih izvora fosilnih goriva izrazito je bitno budući da korištenje fosilnih goriva značajno pridonosi onečišćenju okoliša. Uporaba fosilnih goriva u prijevoznim sredstvima odgovorna je za više od 70% ukupne svjetske emisije ugljičnog monoksida (CO), 40% svih emisija dušikovog oksida (NO_x), 19% svih emisija ugljičnog dioksida (CO₂) i 14% svih emisija stakleničkih plinova [11]. Stoga je jedna od osnovnih prednosti uporabe bioetanola kao goriva smanjenje emisija stakleničkih plinova. Razlog je tome što maseni udio kisika u etanolu iznosi 35%, što rezultira njegovim potpunim izgaranjem u motorima. Predviđa se kako bi se emisije stakleničkih plinova smanjile za oko 12% ukoliko bi vozila koristila bioetanol umjesto benzina [17]. Osim navedenog, bioetanol ima nisku hlapljivost što smanjuje stvaranje smoga. Također, njegovim izgaranjem nastaju niske razine spojeva koji proizvode smog te je manje toksičan za ljude u odnosu na benzin [18]. Osim ekološkog utjecaja fosilnih goriva, predviđa se da će se u sljedećih 40 - 50 godina potrošiti njihove rezerve ukoliko se nastave iscrpljivati današnjom brzinom i aktualnim tehnologijama. S druge strane, sirovine za proizvodnju bioetanola, a posebno ako se govori o lignocelulozi, su obnovljive i lako dostupne u velikim količinama.

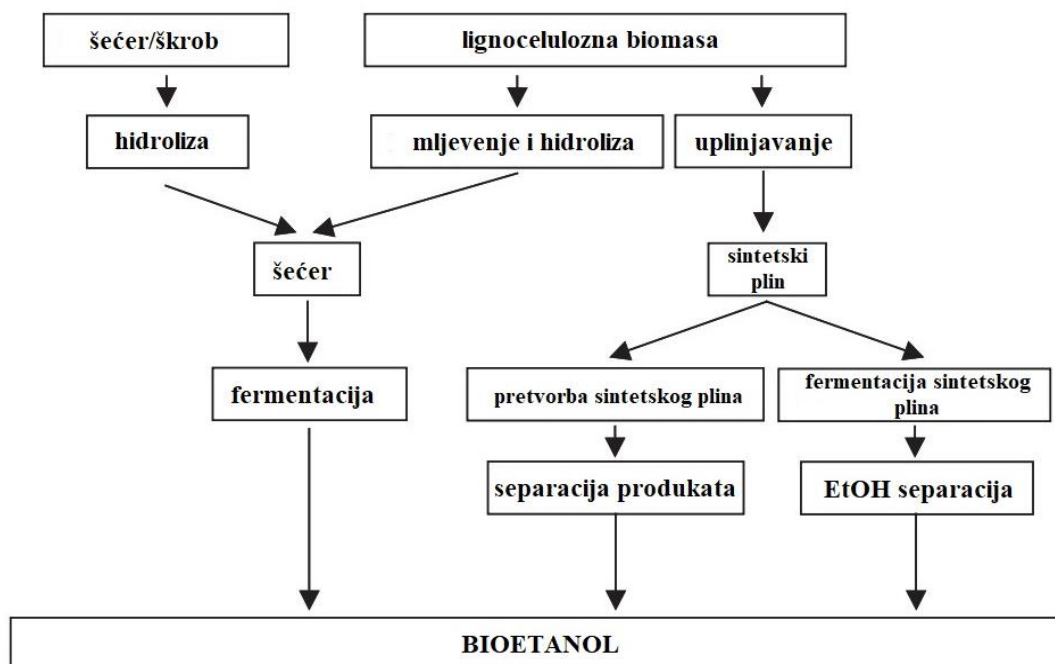
Osim navedenih prednosti proizvodnje i korištenja bioetanola, postoje i određeni izazovi povezani s njegovom proizvodnjom. Osnovni je problem povećanje cijene hrane jer se danas velike količine usjeva (npr. kukuruz, ječam...) upotrebljavaju kao sirovina za proizvodnju bioetanola čime se smanjuju količine dostupne za ljudsku prehranu, što posljedično rezultira rastom cijena usjeva. Osim toga, prenamjena zemljišta za kultiviranje sirovina za proizvodnju bioetanola može rezultirati degradacijom zemljišta, šuma, vodnih resursa i ekosustava te povećanjem emisije stakleničkih plinova [19].

2. 2. Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozna biomasa najzastupljeniji je obnovljivi izvor organskog ugljika na Zemlji. Dominantno ju čine celuloza (33 – 40%), hemiceluloza (20 – 25%) i lignin (15 – 20%), a zbog svoje cijene i dostupnosti smatra se jednom od najznačajnijih sirovina za proizvodnju biogoriva. Najvećim dijelom lignocelulozna biomasa nastaje kao otpad iz poljoprivrede, prehrambene i drvne industrije (npr. trava, slama i drvo). Iako obećavajuća, proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina još uvijek nije komercijalizirana [9].

Za korištenje lignocelulozne sirovine u proizvodnji biogoriva potrebna je njezina priprema koja obuhvaća tri faze: predobradu (predtretman), hidrolizu te, ukoliko je potrebno,

detoksifikaciju nastalih hidrolizata. Postupci predobrade koriste se kako bi se promijenio sastav i struktura sirovine čime se izdvaja lignin i modificira lignocelulozna struktura, hidrolizira hemiceluloza, dekrystalinizira celuloza i stvara površina dostupna enzimima. Osim enzima za predobradu se mogu koristiti i vodena para, organska otapala, kiseline, lužine, amonijak, sumporov dioksid, ionske kapljevine, gama-zrake ili ultrazvuk [20]. Nakon predobrade sirovine slijedi hidroliza strukturnih ugljikohidrata (saharifikacija), fermentacija hidrolizata, te u konačnici izdvajanje i pročišćavanja etanola. Hidroliza celuloze do fermentabilnih šećera najčešće se provodi enzimima izoliranim iz plijesni *Trichoderma reesei* i *Aspergillus niger*. Budući da pri procesu hidrolize može doći do inhibicije produktima i međuproduktima reakcije, nakon hidrolize se provodi istodobna saharifikacija i fermentacija. Opisani proces dobivanja bioetanola iz lignocelulozne biomase prikazan je na Slici 2. Na slici je prikazan još jedan način dobivanja bioetanola, a to je njegova proizvodnja iz šećernih i škrobnih sirovina. Proizvodnja bioetanola iz šećernih i škrobnih sirovina je ekonomski povoljnija od proizvodnje iz lignocelulozne biomase stoga se češće primjenjuje [21].



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz načina proizvodnje bioetanola [12]

2. 2. 1. Pivski trop

Pivski trop je čvrsti nusprodukt pivske industrije koji se dobiva tijekom proizvodnje sladovine neposredno prije fermentacije. Trop je lignocelulozni materijal koji sadrži proteine, vlakna, celulozne i necelulozne polisaharide (uglavnom hemiceluloze i lignin). Kemijski sastav pivskog tropa varira ovisno o vrsti ječma koji se koristi tijekom proizvodnje, vremenu žetve ječma i tehnološkim operacijama koji se upotrebljavaju tijekom proizvodnje. Prilikom proizvodnje 100 L piva, nastaje oko 20 kg tropa kao nusprodukta. Tijekom proizvodnje piva nastaju velike količine nusprodukata koji, ako se ne zbrinjavaju na pravilan način, predstavljaju veliko ekološko opterećenje. Zbog svog kemijskog sastava, pivski trop se smatra vrijednim nusproduktom pivarske industrije koji ima veliki potencijal u dobivanju vrijednih produkata, a izvor je celuloze, hemiceluloze, lignina, vlakna, proteina i vitamina. Danas se također koristi u biotehnologiji kao sirovina za proizvodnju energije, bioplina, bioetanola i sličnih proizvoda [22, 23].

2. 3. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je znatno skuplji proces u odnosu na proces njegove proizvodnje iz šećernih i škrobnih sirovina što ga čini komercijalno neisplativim. Uzroci neisplativosti su prije svega cijena sirovina, troškovi transporta sirovina do proizvodnog pogona te troškovi proizvodnje enzima koji se koriste pri hidrolizi lignoceluloznog materijala. Troškovi proizvodnje mogu se smanjiti učinkovitim korištenjem sirovine, povećanjem iskorištenja bioprocasa, učinkovitim izdvajanjem i pročišćavanjem bioetanola te korištenjem lignina za proizvodnju toplinske i električne energije. Kao što je prethodno navedeno, proizvodnja bioetanola iz lignoceluloze je složen proces koji uključuje: predobradu sirovine, detoksifikaciju, hidrolizu, proizvodnju bioetanola u biorektoru (fermentaciju) te procese izdvajanja i pročišćavanja bioetanola [20].

2. 3. 1. Priprema sirovine

Kako bi postupak proizvodnje bioetanola bio što učinkovitiji, potrebno je pripremiti lignocelulozne sirovine za provedbu procesa. Cilj predobrade sirovina je smanjiti udio lignina i hemiceluloze, kristaličnost i stupanj polimerizacije lanaca celuloze te povećati strukturnu poroznost sirovine. Predtretman mora rezultirati nastankom jednostavnijih šećera, povećati sposobnost stvaranja šećera enzimskom hidrolizom, spriječiti degradaciju i gubitak ugljikohidrata, spriječiti nastanak inhibirajućih spojeva i biti ekonomičan.

Metode predobrade lignocelulozne sirovine koje se koriste pri proizvodnji bioetanol se dijele na:

- fizikalne (usitnjavanje, zračenje, piroliza, ekstruzija)
- kemijske (ozonoliza, hidroliza, oksidativna delignifikacija, organosolv postupak)
- fizikalno-kemijske (eksplozija vodenom parom, eksplozija vlakana s amonijakom, eksplozija s CO₂)
- biološke metode (primjena celulolitičkih enzima te gljiva bijelog i smeđeg truljenja) [21].

2. 3. 2. Hidroliza

Nakon predtretmana slijedi proces hidrolize kojim se iz celuloze i hemiceluloze oslobađaju fermentabilni šećeri (pentoze i heksoze). Hidroliza se provodi u prisutnosti katalizatora, odnosno razrijeđenih, koncentriranih kiselina ili djelovanjem enzima.

2. 3. 2. 1. Hidroliza razrijeđenom kiselinom

S obzirom na to da se hidrolizom celuloze brže stvaraju pentoze nego heksoze, proces se odvija u dva stupnja. Prvi stupanj se provodi pri blažim reakcijskim uvjetima (0,7% vodena otopina H₂SO₄, 190 °C) pri čemu dolazi do depolimerizacije hemiceluloze. Drugi stupanj se provodi djelovanjem slabije kiseline na višoj temperaturi (0,4% vodena otopina H₂SO₄, 250 °C) pri čemu dolazi do hidrolize celuloze do heksoza. Prednost ovog postupka je veća brzina reakcije, a nedostaci manji prinos glukoze te veličina čestica sirovine od svega nekoliko milimetara koja je potrebna za učinkovitu provedbu ovog procesa.

2. 3. 2. 2. Hidroliza koncentriranom kiselinom

Hidroliza koncentriranom sumpornom kiselinom omogućuje potpunu i brzu razgradnju celuloze u glukozu, a hemiceluloze u pentoze. Vrijeme hidrolize je duže u usporedbi s postupkom hidrolize razrijeđenom kiselinom (trajanje 2 - 4 h), a postupak se provodi na temperaturi od 140 - 150 °C i sa 70% vodenom otopinom sumporne kiseline. Na kraju procesa potrebno je izdvojiti i regenerirati kiselinu koja se vraća u proces. Prije procesa fermentacije, smjesa šećera se mora neutralizirati dodatkom Ca(OH)₂ pri čemu dolazi do nastanka taloga CaSO₄·2H₂O koji se izdvaja filtracijom. Prednost ovog procesa je veći prinos glukoze u odnosu na hidrolizu razrijeđenom kiselinom, ali je nedostatak korozivno djelovanje koncentrirane

sumporne kiseline zbog čega reaktori u kojim se provodi hidroliza moraju biti izrađeni od skupljih, korozivno otpornih materijala [24].

2. 3. 2. 3. Enzimska hidroliza

Hidroliza hemiceluloze do fermentabilnih šećera se najčešće provodi djelovanjem enzima pri čemu se celulolitički enzimi (izolirani iz plijesni *Trichoderma reesei* i *Aspergillus niger*) koriste za hidrolizu celuloze, a hemicelulaze za hidrolizu hemiceluloze. Stupanj hidrolize sirovine povećava se proporcionalno s koncentracijom primijenjenih celulolitičkih enzima, ali istovremeno rastu i troškovi ovog procesa. Kako bi proces hidrolize bio ekonomski isplativ potrebno je odrediti optimalnu koncentraciju enzima za njegovu provedbu [20].

Lignocelulozna sirovina se podvrgava procesu predobrade koji prethodi enzimskoj hidrolizi zbog toga što je inače stupanj iskorištenja reakcije vrlo malen. Razlog je u sloju lignina i hemiceluloze koji prekrivaju celulozu i time onemogućuju vezanje lignina na aktivno mjesto enzima. Također, celuloza je najvećim dijelom u kristaličnom obliku koju celulaze sporije hidroliziraju u odnosu na amorfnu celulozu [21].

Prednosti ovog procesa su blagi reakcijski uvjeti (pH 4,8 i temperatura 45 – 50 °C) te visoki prinos šećera, a za razliku od procesa koji se provode djelovanjem kiseline, ne postoje posebni zahtjevi za materijale od kojih su izrađeni reaktori u kojima se hidroliza provodi [24].

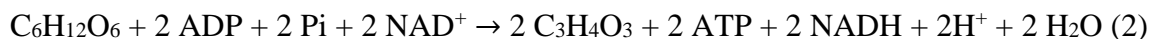
2. 3. 3. Fermentacija

Proizvodnja etanola iz šećera i škroba jedan je od najstarijih biotehnoloških procesa, a taj proces se koristi i danas za dobivanje 80% svjetske proizvodnje biogoriva. Fermentacija šećera u etanol pomoću kvasca rezultat je djelovanja enzima koji pretvaraju 1 mol glukoze u 2 mola etanola i 2 mola ugljikovog dioksida prema sljedećoj jednadžbi kemijske reakcije (Jednadžba 1):

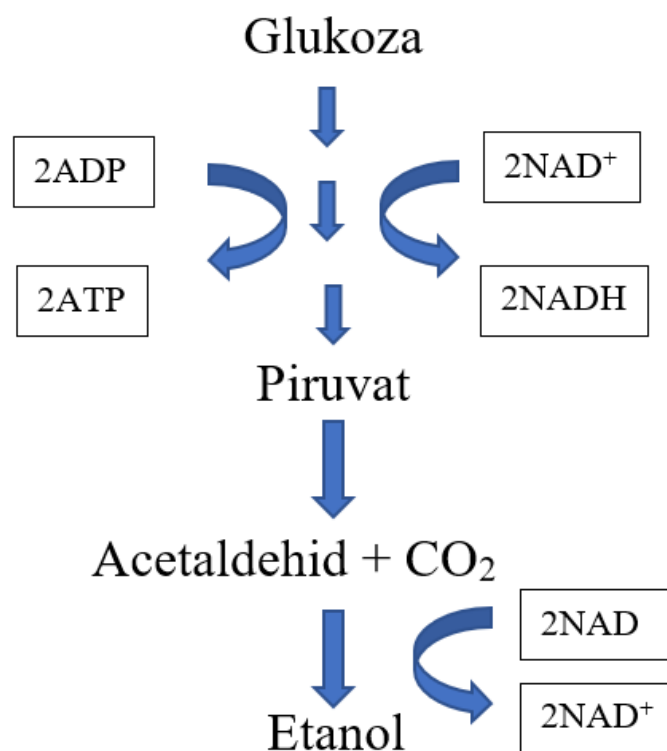


Stehiometrija ove reakcije predstavlja najveći teorijski prinos etanola od 0,511 g po gramu glukoze [25]. U industriji su prinosi u rasponu između 90 - 95% maksimalnog teorijskog prinosa zato što se dio ugljika troši na stvaranje nusprodukata poput glicerola, organskih kiselina i viših alkohola, a može doći i do kontaminacije zbog prisutnosti bakterija mliječne i octene kiseline koje usporavaju rast kvasca [22].

Pojednostavljeni proces alkoholne fermentacije prikazan je na Slici 3. U prvom stupnju reakcije glukoza se prevodi u piruvat (Embden Meyerhof Parnasov put ili glikoliza) što se može prikazati sljedećom jednažbom kemijske reakcije (Jednažba 2):



Nastali piruvat se pomoću enzima piruvat dekarboksilaze prevodi do acetaldehida uz oslobađanje CO_2 , a acetaldehid se potom reducira u etanol enzimom alkohol dehidrogenaza. Na kraju reakcije dolazi do regeneracije NAD^+ koja je neophodna za održavanje redoks ravnoteže i sprječavanje zastoja glikolize.



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz alkoholne fermentacije

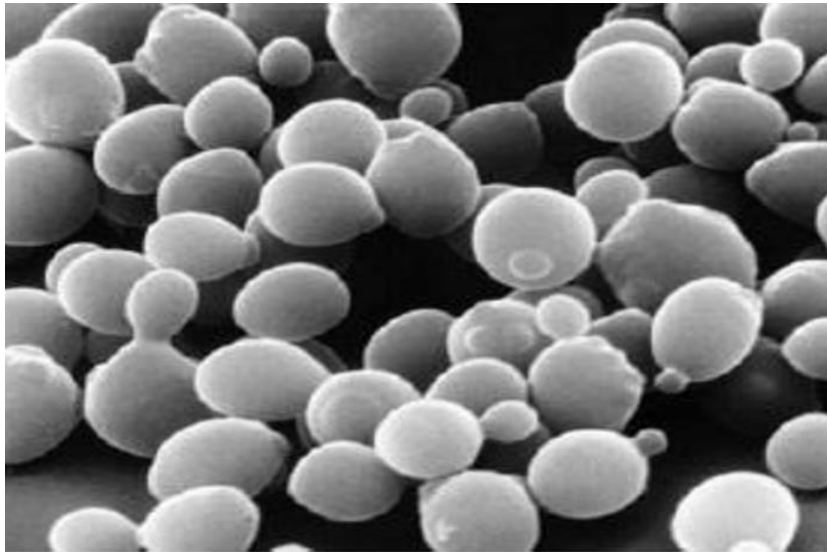
Tipični parametri koji se prate tijekom fermentacije su: optička gustoća kvasca, potrošnja šećera, pH, temperatura, stupanj pjenjenja i koncentracija nastalog etanola. Od posebne su važnosti izračuni količine alkohola, učinkovitosti pretvorbe šećera u etanol i odnos između početne koncentracije šećera i konačnog prinosa etanola [27].

2. 3. 3. 1. Kvasci odgovorni za fermentaciju bioetanola

Jedan od najvažnijih koraka u procesu proizvodnje bioetanola je odabir optimalnog mikroorganizma za provedbu procesa. Odabrani mikroorganizam mora imati veliku produktivnost, toleranciju na visoke količine nastalog etanola, velik prinos etanola, sposobnost pretvorbe više različitih šećera i otpornost na prisutne inhibitore. Također, poželjni su organizmi otporni na visoke temperature kako bi se izbjegla kontaminacija drugim mikroorganizmima povećanjem temperature fermentacije zbog čega nije potrebna sterilizacija sirovine i opreme, a sam proces postaje ekonomski isplativiji [5]. Za proizvodnju bioetanola se mogu koristiti razni mikroorganizmi poput bakterija i kvasaca koji se ističu velikom specifičnom brzinom rasta, učinkovitom represijom glukoze, tolerancijom na okolišni stres i učinkovitom proizvodnjom etanola [28]. Kvasci se najviše koriste u proizvodnji zbog visokog iskorištenja etanola (>90% teoretskog prinosa), toleranciji na etanol (>40 g/L), a uz to rastu u jednostavnim i jeftinim medijima [4]. Gotovo sva svjetska proizvodnja bioetanola provodi se pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* [29].

S. cerevisiae (Slika 4.), koji se još naziva i pekarski ili vinski kvasac, predstavlja najviše proučavanu vrstu kvasaca i najkorišteniji kvasac u modernim industrijskim procesima. Pripada koljenu *Ascomycota* i prvi je eukariot čiji je cijeli genom sekvenciran te predstavlja “modelni kvasac” za istraživanje drugih kvasaca [18, 19].

S. cerevisiae je heterotrof tj. za rast su mu potrebni ugljikohidrati koje uzima iz organskih tvari. Najbolje raste pri blagim temperaturama u rasponu 25 – 40 °C i posjeduje sposobnost prilagodbe različitim koncentracijama kisika u okolini. Pri većim koncentracijama kisika respiratorni enzimi pretvaraju šećer u CO₂, H₂ i O₂ kao i međuprodukte potrebne za rast stanične biomase. Pri niskim koncentracijama kisika smanjuje se aktivnost respiratornih enzima i dolazi do fermentacije pri čemu se šećer koristi za energiju, a kao nusprodukt nastaje etanol [29]. *S. cerevisiae* se primjenjuje za proizvodnju etanola zbog visokog prinosa koji iznosi između 0,45 – 0,50 g_{etanola}/g_{glukoza}, visoke produktivnosti od 2 - 5 g/(L·h) te mogućnosti rasta pri visokim koncentracijama šećera i etanola [26]. Također, prednost *S. cerevisiae* je široki raspon pH-vrijednosti koje podnosi što smanjuje mogućnost kontaminacije [4]. Nedostatak korištenja *S. cerevisiae* za proizvodnju bioetanola je nemogućnost rasta na pentozama, laktozi i polisaharidima zbog toga što njegov metabolizam ne stvara odgovarajuće enzime, a pentofosfatni put ne radi učinkovito. Zbog toga se sve više istražuju mikroorganizmi s mogućnošću fermentacije tih spojeva (kvasci *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, rodovi *Candida* i *Pichia*) [28], a nedavno su stvoreni rekombinantni sojevi *S. cerevisiae* sposobni za fermentaciju pentoznih šećera [31].



Slika 4. Mikroskopska fotografija *Saccharomyces cerevisiae* [32]

Druge vrste kvasaca iz roda *Saccharomyces* fermentiraju slične supstrate i imaju sličnu učinkovitost proizvodnje bioetanola, ali na kvascu *S. cerevisiae* ostaje primarni fokus istraživanja za proizvodnju bioetanola [33].

2. 3. 1. 2. Ne-*Saccharomyces* kvasci (nekonvencionalni kvasci)

Nekonvencionalni kvasci (Tablica 2.) predstavljaju ogroman, ali slabo iskorišteni resurs bioraznolikosti kvasaca. Mnogi od njih pokazuju industrijski poželjne osobine kao što su sposobnost korištenja složenih supstrata kao hranjivih tvari i toleranciju na inhibitore fermentacije te okolišni stres (osmotski stres, stres etanola, toplinski stres i različita naprežanja inhibitora fermentacije). Nekonvencionalni kvasci razvili su specifične mehanizme za preživljavanje u ekstremnim uvjetima, a pretpostavlja se da posjeduju jedinstvene mehanizme koji nisu prisutni u *S. cerevisiae* te se stoga sve češće istražuju njihove osobine s ciljem industrijske primjene [5].

Tablica 2. Pregled nekonvencionalnih kvasaca korištenih pri proizvodnji bioetanola [27]

Vrsta	Karakteristike	Nedostaci
<i>Pichia stipitis</i> , <i>Candida shehatae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i>	Sposobni fermentirati pentoze (npr. ksilozu, arabinozu) u etanol	Nemaju posebno visoku toleranciju na etanol, potrebna značajna eksploatacija prije industrijske primjene
<i>Hansenula polymorpha</i>	Sposoban fermentirati ksilozu pri visokoj temperaturi	Nije ispitan u industrijskoj proizvodnji
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Divlji kvasac za koji se pretpostavlja da je otporan na stresne uvjete	Nije komercijaliziran, potrebna su daljnja istraživanja prije eksploatacije i industrijske primjene
<i>Candida krusei</i>	Proizvodi niske koncentracije sekundarnih metabolita	Nije komercijaliziran, potrebna su daljnja istraživanja prije eksploatacije i industrijske primjene

Osim kvasaca, veliki broj bakterija ima mogućnost proizvodnje etanola, ali ih većina proizvodi i nusprodukte poput butanola, octene kiseline, mravlje kiseline, glicerola, acetona, metana i izopropilnog alkohola. Većina bakterija koje proizvode etanol kao glavni proizvod pripadaju rodovima *Clostridium*, *Zymomonas*, *Sarcina*, *Leuconostoc* i *Klebsiella* [5].

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* važan je s industrijskog stajališta budući da njegova termotolerancija omogućuje rast pri temperaturama do 52 °C te fermentaciju pri temperaturama iznad 40 °C. Navedeno svojstvo dovodi do smanjenja troškova hlađenja tijekom fermentacije te rizika od kontaminacije, pojednostavljuje se uklanjanje etanola što predstavlja prednost kod simultane enzimске saharifikacije i fermentacije. Problem pri korištenju ovog kvasca predstavlja prevođenje ksiloze u ksilitol, a ne u etanol, što negativno utječe na ekonomičnost procesa proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina. Kvasac *Pichia stipitis* jedan je od rijetkih kvasaca koji mogu fermentirati ksilozu, stoga je također bitan s industrijskog gledišta. Neki sojevi ovog kvasca proizvode 6 g/L etanola što je 67% teorijskog prinosa etanola nakon 10 dana u primijenjenoj hranjivoj podlozi sa 2% ksiloze. Brzine potrošnje šećera u ovom kvascu manje su nego u *S. cerevisiae*, stoga je za veći prinos etanola potrebno optimirati sastav hranjive podloge ili primijeniti genetičke modifikacije [26].

3. Eksperimentalni dio

U svrhu razvoja procesa proizvodnje bioetanola iz hidrolizata pivskog tropa ispitano je sedam kvasaca. U seriji šaržnih pokusa s odabranim kvascima pri istoj početnoj koncentraciji glukoze, a na temelju pokazatelja uspješnosti bioprocasa (brzina reakcije, prinos, konverzija, iskorištenje itd.) odabran je najbolji kvasac za daljnju provedbu procesa. S odabranim tipom kvasca nadalje je ispitan utjecaj početne koncentracije šećera na proizvodnju bioetanola kao i dvije različita načina provedbe procesa: šaržni proces i šaržni proces s dotokom supstrata. Pri optimalnim uvjetima i s odabranim kvascem proveden je proces fermentacije hidrolizata pivskog tropa.

3. 1. Materijali

3. 1. 1. Kemikalije

Za provedbu eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- 3,5-dinitrosalicinska kiselina, Fluka, Kina
- aktivni ugljen, Lach-Ner, Češka
- amonijev sulfat, Kemika, Hrvatska
- D(+)-glukoza, Gram mol, Hrvatska
- detergent heksadecil-trimetil-amonijev bromid (CTAB), Sigma Aldrich, Austrija
- di-amonijev hidrogenfosfat, Fluka, Kina
- di-natrijev hidrogenfosfat, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- etanol, Gram mol, Hrvatska
- glukoza GOD-PAP test, Greiner Diagnostic GmbH, Njemačka
- glukoza PA test, Dijagnostika, Hrvatska
- kalcijev hidroksid, Gram Mol, Hrvatska
- kalijev-natrijev-tartarat-tetrahidrat, Kemika, Hrvatska
- krumpirov agar (PDA), Biolife, Italija
- kvaščevo ekstrakt, Liofilchem, Italija
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, Merck, Njemačka
- natrijev hidroksid, Gram Mol, Hrvatska

Kvasci korišteni u ovom istraživanju kupljeni su lokalnoj trgovini i specijaliziranoj tvrtki za prodaju sirovina u pivskoj industriji (Beershop j.d.o.o., Hrvatska), a navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Kvasci korišteni u istraživanju

Naziv	Vrsta	Proizvođač	Namjena
Suhi kvasac	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Podravka d.d.	Povećavanje volumena tijesta
Vinski kvasac	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	Pa-vin d.o.o.	Provođenje alkoholne fermentacije
Instant kvasac	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lidl Stiftung & Co. KG	Povećavanje volumena tijesta
Svježi kvasac	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lesaffre Adriatic d.o.o.	Povećavanje volumena tijesta
<i>Bavarian Lager yeast M76</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Saccharomyces pastorianus</i>	Mangrove Jack's, Bevie Handcraft NZ Limited	Izrada piva
<i>Belgian Ale M41</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae diastaticus</i>	Mangrove Jack's, Bevie Handcraft NZ Limited	Izrada piva
<i>Cider yeast M02</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Mangrove Jack's, Bevie Handcraft NZ Limited	Izrada jabučnog vina

Za hidrolizu pivskog tropa korištena je čista kultura gljive *Thermomyces lanuginosus* koja je dobivena iz Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Njemačka. Kultura je čuvana pri 4 °C na prethodno pripremljenom krumpirovom agaru, a precjepljivanje je provođeno svaka 2 tjedna u sterilnim uvjetima.

3. 1. 2. Oprema

Za provedbu eksperimenta korištena je sljedeća oprema:

- centrifuga, Universal 320 R, Hettich, SAD
- inkubator, BINDER GmbH, KB 115, Njemačka
- kapljevinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) s pumpom (G7104A 1290 Flexible Pump), injektorom (G7129B 1290 Vialsampler, analitičkom kolonom (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150·7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektorom indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnim programom za kromatografiju (OpenLAB CDS).
- laboratorijska tresilica, Crux d.o.o., Hrvatska
- magnetska miješalica, MS-3000, Biosan, Latvija
- magnetska miješalica, Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija

- pH-metar Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- plinski kromatograf (Shimadzu GC-2014, Japan) s FID detektorom i Zebron ZB-Wax GC kapilarnom kolonom (dužina 30 m, ID 0,53 mm i debljina filma 1,00 μm , Phenomenex, SAD)
- pumpa, Harvard PHD 4400 Programmable, Harvard Apparatus, Inc, SAD
- spektrofotometar, UV-1601, Shimadzu, Japan
- sterilizator, Sutjeska, Srbija
- vodena kupelj, Thermomix 1420, Braun, Njemačka

3. 2. Metode

3. 2. 1. Priprema reakcijskog pufera

Natrij-natrij (Na-Na) fosfatni pufer ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) pH 5,8 priprema se miješanjem 0,1 mol/L vodenih otopina natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata i di-natrijevog hidrogenfosfata. Otopina natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata priprema se dodavanjem 6,89 g soli natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata u 500 mL ultračiste vode, a otopina di-natrijevog hidrogenfosfata otapanjem 1,42 g soli u 100 mL ultračiste vode. Nakon potpunog otapanja komponenti, ovako dobivene otopine pomiješane su u potrebnim omjerima do postizanja željene pH-vrijednosti.

3. 2. 2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih šećera

3. 2. 2. 1. Priprema DNS reagensa

U odmjernoj tikvici volumena 200 mL postepenim otapanjem otopljeno je 4,36 g 3,5-dinitrosalicinske kiseline u 160 mL otopine natrijeva hidroksida koncentracije 0,5 mol/L. Otapanje se provodi uz konstantno miješanje u vodenoj kupelji na 70 °C. Nakon potpunog otapanja 3,5-dinitrosalicinske kiseline, postepeno se dodaje 60 g kalijeva natrijeva tartarata tetrahidrata uz konstanto miješanje u vodenoj kupelji na 70 °C. Nakon potpunog otapanja dobiveni DNS reagens se hladi na sobnoj temperaturi (25 °C) te nadopuni destiliranom vodom do oznake. DNS reagens je potrebno čuvati u tamnoj boci [34].

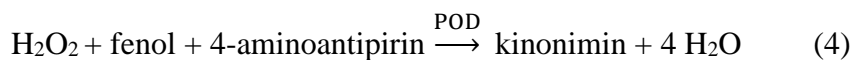
3. 2. 2. 2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih šećera

Za određivanje koncentracije ukupnih šećera u uzorku potrebno je izraditi baždarni dijagram za glukozu.

Za izradu baždarnog dijagrama (Prilog 1.) korištena je standardna otopina glukoze koncentracije $c = 5,550 \text{ mmol/L}$ koja se razrijedi u Eppendorf vialicama na šest otopina koncentracija u rasponu $0,173 - 5,550 \text{ mmol/L}$. U epruvetu se dodaje $1,5 \text{ mL}$ DNS reagensa, $0,5 \text{ mL}$ otopine glukoze i $0,5 \text{ mL}$ destilirane vode. Smjesa se zagrijava 15 minuta u vodenoj kupelji na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ te se zatim hladi u hladnoj vodenoj kupelji na sobnoj temperaturi ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) 15 minuta. Nakon što se uzorak ohladio, mjeri mu se apsorbancija na valnoj duljini 575 nm . Baždarni dijagram predstavlja ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji glukoze [35].

3. 2. 3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze

Najčešće korištena metoda za određivanje koncentracije glukoze je enzimska GOD-PAP kolorimetrijska metoda čiji je princip prikazan Jednadžbama 3 i 4. Enzim glukoza-oksidaža (GOD) katalizira oksidaciju glukoze u glukonsku kiselinu, a pritom se oslobađa vodikov peroksid. Potom enzim glukoza-oksidaža reagira s 4-hidroksibenzoatom i 4-amino-fenazonom (PAP) u prisutnosti peroksidaze pri čemu nastaje crveno obojeni kinonimin čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji glukoze prisutne u uzorku [36].



3. 2. 3. 1. Priprema radnog reagensa za određivanje koncentracije glukoze

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze u uzorku potrebno je pripremiti radni reagens korištenjem:

- *R1 reagens*: otopina 4-aminoantipirina (PAP), $c = 0,40 \text{ mmol/L}$, glukoza-oksidaža (GOD) $> 300 \text{ kat/L}$, peroksidaza (POD) $> 17 \text{ kat/L}$
- *R2 pufer*: fosfatni pufer, pH $7,40$, $c = 100 \text{ mmol/L}$; otopina fenola, $c = 10 \text{ mmol/L}$

Radni reagens se pripremi na način da se R1 reagens otopi u puferu R2.

3. 2. 3. 2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije glukoze

Koncentracija glukoze u uzorku određuje se spektrofotometrijski pri apsorbanciji od 500 nm na temelju intenziteta obojenja otopine. Za izradu baždarnog dijagrama korištena je standardna otopina glukoze koncentracije $c = 5,550 \text{ mmol/L}$ koja se razrijedi u Eppendorf vialicama na šest otopina koncentracija u rasponu $0,173 - 5,550 \text{ mmol/L}$. Mjerenje se

provodilo na način da se u prazne plastične kivete dodalo 1 mL radnog reagensa i 10 μ L uzorka. Smjesa se potom homogenizira i ostavi 20 minuta na 25 °C. Nakon točno 20 min spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini $\lambda = 500$ nm. Svi uzorci su analizirani u tri paralelne probe. Slijepa proba umjesto 10 μ L uzorka sadrži istu količinu reakcijskog pufera. Nepoznata koncentracija glukoze u uzorku se određuje pomoću dobivenog baždarnog dijagrama (Prilog 2.).

3. 2. 4. Određivanje sastava lignoceluloznog materijala nakon hidrolize

Sastav lignoceluloznog materijala određen je kapljevinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC). Za pripremu uzorka uzeto je 750 μ L supernatanta uzorka u kojega je dodano 750 μ L 10%-tne otopine ZnSO₄ koja veže proteine i nečistoće nastale tijekom procesa. Sadržaj se homogenizira i ostavi 20 min na 25°C. Potom se uzorci centrifugiraju na 13500 o/min tijekom 5 min pri 25 °C. 1,5 mL nastalog supernatanta se potom filtrira kroz mikrobiološki filter (0,2 μ m, Sartorius) u staklenu vijalu te se tako pripremljen uzorak koristio za UPLC analizu. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 mol/L otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μ L, a protok mobilne faze 0,6 mL/min. Temperatura kolone iznosila je 60 °C. Dobiveni kromatogrami analizirani su programom OpenLab CDS (Agilent, SAD). Iz dobivenih kromatograma izračunata je koncentracija tvari pomoću baždarnih pravaca (Prilog 3.).

3. 2. 5. Određivanje koncentracije etanola

Koncentracija etanola određivana je plinskim kromatografom opremljenim s plameno-ionizacijskim detektorom, korištenjem plina dušika kao nosioca, na polarnoj koloni ZB-WAX ($l = 30$ m; ID = 0,53 mm; $df = 1$ μ m). Temperatura injektora i detektora bila je 240 °C. Kolona se grijala 1 min na temperaturi 50 °C, nakon čega se zagrijavala na 125 °C tijekom 6 minuta.

Prije analize na plinskom kromatografu svaki uzorak je filtriran kako bi se uklonile stanice i enzimi (Filter Chromafil Xtra PA-20/25; 0,2 μ m, 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka).

Vrijeme zadržavanja etanola bilo je 1,73 min. Na temelju dobivenog baždarnog pravca za etanol (Prilog 4.) određivana je koncentracija u nepoznatom uzorku. Svi uzorci su analizirani u tri paralelna mjerenja.

3. 2. 6. Određivanje koncentracije kvasaca

Koncentracija kvasca u uzorku mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) [35, 36, 37]. Uzorke stanica kvasca bilo je potrebno razrijediti prije mjerenja kako bi izmjerena apsorbancija bila $< 1,0$. Prije samog određivanja koncentracije kvasaca napravljen je baždarni dijagram mjerenjem apsorbancije suspenzija poznatih koncentracija kvasaca (npr. $\gamma = (OD_{600} - 0,4955)/0,6849$).

3. 2. 7. Fermentacija s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL

Preliminarna ispitivanja procesa fermentacije provedena su u anaerobnim uvjetima korištenjem sedam različitih kvasaca (Tablica 3.) pri čemu je početna koncentracija kvasaca bila $\gamma = 1$ g/L. Hranjiva podloga koja je korištena za provedbu fermentacije sadržavala je 0,1 mol/L Na-Na fosfatnog pufera (pH = 5,8), glukozu ($\gamma = 1$ g/L), kvaščev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L) te soli $(NH_4)_2HPO_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i $(NH_4)_2SO_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L). Nakon sterilizacije podloge i hlađenja, reakcija je započeta dodatkom 0,01 g kvasaca u hranjivu podlogu volumena 10 mL. Proces je proveden anaerobno na laboratorijskoj tresilici pri 30 °C i 100 o/min. U vremenskim intervalima od 30 min uzimani su uzorci iz reaktora u kojima su nakon filtracije (CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) određene koncentracije glukoze i etanola.

3. 2. 8. Fermentacija s permeabiliziranim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL

Za provedbu procesa proizvodnje bioetanola s permeabiliziranim stanicama kvasca bilo je potrebno prvo pripremiti permeabilizirane stanice. Za permeabilizaciju stanica kvasca korištena je 0,2 % otopina detergenta heksadecil-trimetil-amonijevog bromida (CTAB), a stanice su permeabilizane tako da je 0,01 g stanica kvasca pomiješano s 1 mL otopine detergenta na homogenizatoru tijekom 15 minuta. Stanice kvasca su potom centrifugirane (4500 o/min, 15 min), a detergent iznad njih dekantiran. Kvasac je potom ispran s 0,1 mol/L Na-Na fosfatnim puferom pH 5,8 kako bi se uklonio višak detergenta. Postupak ispiranja detergenta ponovljen je tri puta. Stanice kvasca su po završetku ispiranja resuspendirane u 1 mL 0,1 mol/L Na-Na fosfatnom puferu pH 5,8. Tako pripremljene stanice kvasca dodane su u sterilnu hranjivu podlogu koja je pripremljena otapanjem 0,01 g glukoze u 9 mL 0,1 mol/L Na-Na fosfatnog pufera pH 5,8. Proces je proveden anaerobno na laboratorijskoj tresilici pri 30 °C i 100 o/min. U vremenskim intervalima od 30 min uzimani su uzorci iz reaktora u kojima su nakon filtracije

(CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) određene koncentracije glukoze i etanola.

3. 2. 9. Fermentacija s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 250 \text{ mL}$

Kako bi se ispitaio utjecaj početne koncentracije šećera na proizvodnju bioetanola, fermentacija je provedena korištenjem sterilne podloge sastava: $0,1 \text{ mol/L}$ Na-Na fosfatni pufer ($\text{pH} = 5,8$), kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5 \text{ g/L}$), soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 1,0 \text{ g/L}$) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 1,0 \text{ g/L}$) te glukoza različitih početnih koncentracija: $\gamma = 5 \text{ g/L}$, $\gamma = 10 \text{ g/L}$ i $\gamma = 50 \text{ g/L}$. Hranjive podloge su sterilizirane te ohlađene. Reakcija je provedena reaktoru volumena 200 mL , pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i 100 o/min na laboratorijskoj tresilici s dva tipa kvasca koji su u preliminarnim istraživanjima proizveli najviše etanola (Slika 5.).



Slika 5. Provedba reakcije fermentacije u Erlenmeyer tikvicama

3. 2. 10. Fermentacija s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata

Proces fermentacije u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata proveden je u reaktoru prikazanom na Slici 6. Sustav se sastoji od reaktora postavljenog na magnetnoj miješalici, vodene kupelji te klipne pumpe kojom je osiguran kontinuirani dotok svježeg supstrata u

reaktor. Masena koncentracija i protok glukoze u dotoku izračunati su na temelju brzine potrošnje glukoze iz pokusa provedenih u šaržnom reaktoru te su iznosili: 200 g/L i 21 $\mu\text{L}/\text{min}$ te 42 $\mu\text{L}/\text{min}$. Početni volumen hranjive podloge u reaktoru je iznosio 0,5 L, a podloga je bila sljedećeg sastava: 0,1 mol/L Na-Na fosfatni pufer (pH = 5,8), glukoza ($\gamma = 5$ g/L), kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L) te soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L). Podloga je sterilizirana, ohlađena te je u nju dodan kvasac ($\gamma = 1,0$ g/L) čime je aproksimiran početak provedbe procesa.

Uzorci reakcijske smjese uzimani su sterilno u prethodno definiranim vremenskim intervalima te su u uzorcima određene koncentracije glukoze, biomase i etanola. Uzorak se uzimao sterilno pomoću sterilne petlje prikazane na Slici 7. Kada je koncentracija glukoze pala na 2,5 g/L (polovica početne vrijednosti) započet je kontinuirani dotok svježeg supstrata.

Fermentacija je prekinuta u trenutku kada su vrijednosti koncentracije biomase počele padati (stanice kvasca su počele odumirati) što je za posljedicu imalo porast koncentracije glukoze.



Slika 6. Aparatura za provedbu reakcije fermentacije u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata



Slika 7. Aparatura za sterilno uzimanje uzorka reakcijske smjese iz reaktora

3. 2. 11. Provedba procesa fermentacije korištenjem enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog tropa

3. 2. 11. 1. Enzimska hidroliza pivskog tropa

Enzimska hidroliza pivskog tropa provedena je pomoću gljive *Thermomyces lanuginosus* uzgojene na hranjivoj podlozi koja je sadržavala krumpirov agar (PDA) i ekstrakt kvasca. Podloga je sterilizirana na temperaturi 121 °C, a sterilizacija je trajala 20 minuta. Uzgoj je trajao 10 dana na 45 °C, a proveden je u inkubatoru.

Uzorci pivskog tropa prikupljeni su iz Osječke pivovare, a nakon prikupljanja pivski trop je osušen na 60 °C te je skladišten na sobnoj temperaturi. 30 g pivskog tropa pomiješano je s 55 mL destilirane vode u laboratorijskim staklenkama od 720 mL. Tako pripremljen uzorak je steriliziran na temperaturi 121 °C u trajanju od 15 min. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu (25 °C) supstrat je inokuliran s pet micelijskih čepova (promjera 1 cm) suspendiranih u 5 mL sterilne destilirane vode. Nakon inokulacije, enzimska hidroliza lignoceluloze provedena je na 45 °C tijekom 7 dana u inkubatoru [37].

Ekstrakcija biološki obrađenog pivskog tropa provedena je u destiliranoj vodi u omjeru kruto:kapljevito 1:7. Ekstrakcija je provedena na 25 °C tijekom 1 h i 200 o/min na laboratorijskoj tresilici. Nakon ekstrakcije uzorci su profiltrirani vakuum filtracijom i sterilizirani na 121 °C tijekom 15 min. Prije i nakon sterilizacije određen je sastav dobivenih hidrolizata na UPLC-u.

3. 2. 11. 2. Kiselinska hidroliza pivskog tropa

Izvagano je 1 kg suhe tvari pivskog tropa koja je prebačena u visokotlačni reaktor. U reaktor je dodatno 10 L vodene otopine 0,5% H₂SO₄. Kiselinska hidroliza provedena je pri 180 °C tijekom 10 minuta. Nakon obrade odvojeno je 6,8 L kiselinskog hidrolizata pivskog tropa (kapljevita faza) i 170 g nehidroliziranog ostatka pivskog tropa (čvrsta faza). Kapljevita faza je ohlađena, centrifugirana na 5000 o/min tijekom 30 min te je izdvojen supernatant.

Iz hidrolizata pivskog tropa uzeto je 800 mL kapljevine koja je centrifugirana dodatno na 5000 o/min tijekom 10 min. Nakon centrifugiranja supernatant je podijeljen na četiri dijela, svaki volumena 200 mL. Jedan dio tretiran je s NaOH kako bi se postigao pH 5,8 budući da je početni pH iznosio 1,9, dok je drugi dio tretiran dodatkom Ca(OH)₂ do postizanja iste pH vrijednosti. Hidrolizat tretiran Ca(OH)₂ je potom centrifugiran 10 minuta kako bi se uklonio nastali talog.

Preostalih 400 mL je prije tretmana s NaOH i Ca(OH)₂ dodatno obrađeno s 18 g/L aktivnog ugljena kako bi se uklonili inhibitori te je otopina miješana tijekom 1 h. Aktivni ugljen je potom uklonjen vakuum-filtracijom na Büchnerovom lijevku. Dobivena otopina je podijeljena na dva jednaka dijela volumena od 200 mL. Jedna polovica je tretirana s NaOH dok je druga obrađena s Ca(OH)₂ kako bi se postigao pH 5,8.

3. 2. 11. 3. Fermentacija hidrolizata pivskog tropa

U različito pripremljene hidrolizate pivskog tropa dodan je kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L) te soli (NH₄)₂HPO₄ ($\gamma = 1,0$ g/L) i (NH₄)₂SO₄ ($\gamma = 1,0$ g/L). Uzorci su sterilizirani na temperaturi 121 °C u trajanju od 15 min.

Fermentacija je počela dodatkom kvasca u šaržni reaktor volumena 200 mL. Proces je provedene pri temperaturi 30 °C, a smjesa je miješana na laboratorijskoj tresilici pri 100 o/min. U prethodno definiranim vremenskim intervalima praćene su koncentracije ukupnih šećera, glukoze, etanola i kvasaca na temelju kojih su izračunati pokazatelji uspješnosti bioprocasa.

3. 2. 12. Određivanje uspješnosti bioprocasa

U ovom istraživanju korišteni su sljedeći pokazatelji bioprocasa kako bi se pratila njegova uspješnost:

- Prinos produkta (Y_P) (Jednadžba 5):

$$Y_P = \gamma_{P, \text{kon}} - \gamma_{P, \text{poč}} \quad (5)$$

- Koeficijent iskorištenja biomase na supstratu ($Y_{X/S}$) (Jednadžba 6):

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\gamma_{X, \text{kon}} - \gamma_{X, \text{poč}}}{\gamma_{S, \text{poč}} - \gamma_{S, \text{kon}}} \quad (6)$$

- Koeficijent iskorištenja produkta na supstratu ($Y_{P/S}$) (Jednadžba 7):

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{Y_P}{\gamma_{S, \text{poč}} - \gamma_{S, \text{kon}}} \quad (7)$$

- Učinkovitost bioprocasa (E) (Jednadžba 8):

$$E = \frac{Y_{P/S}}{0,51145} \cdot 100\% \quad (8)$$

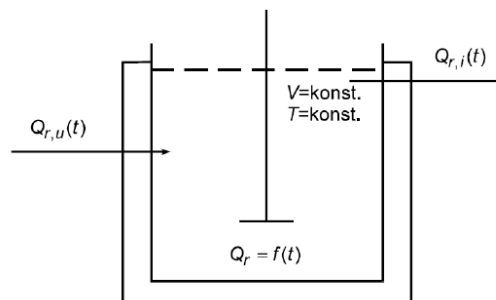
- Produktivnost bioprocasa (Pr) (Jednadžba 9):

$$Pr = \frac{Y_P}{t} \quad (9)$$

3. 2. 13. Matematički model procesa proizvodnje bioetanola – reaktorski i kinetički modeli

3. 2. 13. 1. Šaržni reaktor

Šaržni ili kotlasti reaktor je tip reaktora koji se dominantno koristi u procesnoj industriji. Ovaj tip reaktora koristi se za provedbu različitih vrsta kemijskih i biokemijskih reakcija. Tipični šaržni reaktor (Slika 8.) sastoji se od spremnika s miješalicom (čime se osigurava homogenost reakcije smjese) i integriranog sustava za grijanje/hlađenje (čime se osigurava provedba reakcije pri konstantnoj temperaturi). Ovaj tip reaktora radi u nestacionarnom stanju što znači da veličine stanja ovise o vremenu. Najčešće se razlikuju u volumenu i materijalima od kojih se izrađuju (čelik, nehrđajući čelik, legure, staklo, cement, plastika...) [38].



Slika 8. Šaržni reaktor [39]

Kada se reakcija provodi u šaržnom reaktoru, sve komponente reakcijske smjese se unesu u reaktor na početku provedbe procesa, a za vrijeme provedbe reakcije nema izmjene tvari s okolinom, odnosno reaktor se prazni tek kada se reakcija provede.

Matematički model reaktora predstavljaju bilance tvari za pojedine komponente koje sudjeluju u reakcijskoj smjesi. U slučaju reakcije u kojoj jedan reaktant (S) daje jedan produkt

(P) uz prisutnost biomase (X), bilance tvari se mogu prikazati na način kako je to navedeno Jednadžbama 10, 11 i 12 (Prilog 5.) [39].

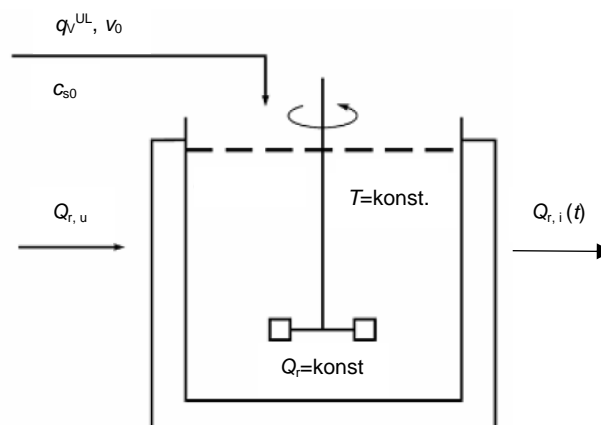
$$\frac{dy_S}{dt} = -\mu \cdot \frac{Y_X}{Y_{X/S}} \quad (10)$$

$$\frac{dy_P}{dt} = \mu \cdot \frac{Y_X}{Y_{X/P}} \quad (11)$$

$$\frac{dy_X}{dt} = \mu \cdot Y_X \quad (12)$$

3. 2. 13. 2. Šaržni reaktor s dotokom

Šaržni ili kotlasti reaktor s dotokom (Slika 9.) je tip reaktora u kojem se kontinuirano ili povremeno uvodi reakcijska smjesa. Najčešće se upotrebljava u slučaju kada je supstrat inhibitor ili je toksičan pa ga je potrebno postepeno dovoditi u reaktor. S obzirom da se reakcijska smjesa kontinuirano ili povremeno dovodi u reaktor, dolazi do povećanja volumena reakcijske smjese te su i kod ove vrste reaktora procesne veličine nestacionarne. Prilikom postavljanja matematičkog modela procesa za šaržni reaktor s dotokom uvodi se pretpostavka o idealnom miješanju reakcijske smjese što podrazumijeva da je sastav reakcijske smjese jednak u svakoj točki reaktora (navedeno se koristi i kod postavljanja matematičkog modela/bilanci tvari šaržnog reaktora).



Slika 9. Šaržni reaktor s dotokom [38]

U slučaju da u reakciji sudjeluje samo jedan reaktant S, bilanca tvari u šaržnom reaktoru s dotokom može se prikazati pomoću Jednadžbi 13 – 19 (Prilog 6. – 8.).

$$\frac{dV}{dt} = q_v^{UL} \quad (13)$$

$$\frac{dm_x}{dt} = \mu \cdot m_x \quad (14)$$

$$\frac{dm_S}{dt} = \frac{q_v}{V} m_{S0} - \mu \cdot \frac{m_x}{Y_{X/S}} \quad (15)$$

$$\frac{dm_P}{dt} = \mu \cdot \frac{m_x}{Y_{X/P}} \quad (16)$$

$$\gamma_X = \frac{m_x}{V} \quad (17)$$

$$\gamma_S = \frac{m_S}{V} \quad (18)$$

$$\gamma_P = \frac{m_P}{V} \quad (19)$$

3. 2. 14. Ghose-Tyagi-ova modifikacija jednadžbe Monodove kinetike za opis procesa alkoholne fermentacije

T. K. Ghose i R. D. Tyagi u svom radu su ispitali inhibiciju produkta i supstrata na provedu procesa fermentacije te su došli do zaključka da učinci etanola (P) na brzinu rasta stanica kvasca i fermentacijsku aktivnost stanica slijede linearni obrazac. Monodova kinetika proširena je s izrazom za inhibiciju supstrata te je prikazan Jednadžbom 20 (Prilog 7.) [36, 37].

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{\gamma_S}{K_S + \gamma_S} \right) \cdot \left(1 - \frac{\gamma_P}{\gamma_{P'}} \right) \quad (20)$$

Zbog promjene volumena reakcijske smjese u šaržnom reaktoru s dotokom Jednadžba 20 poprima oblik Jednadžbe 21:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{m_S}{K_S + m_S} \cdot \left(1 - \frac{m_P}{m_{P'}} \right) \quad (21)$$

3. 2. 15. Obrada podataka

Eksperimentalni podaci dobiveni su u obliku vremenske ovisnosti koncentracije biomase, supstrata i produkta pri uvjetima kod kojih su provedeni pokusi. Parametri matematičkog modela procesa su procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata nelinearnom regresijom, odnosno korištenjem simpleks metode i metode najmanjih kvadrata ugrađenih u programski paket SCIENTIST (MicroMath® Scientist® for Windows™, Version 2.0).

Procjena parametara matematičkog modela obuhvaća usporedbu rezultata dobivenih pomoću matematičkog modela s eksperimentalnim podacima te ponovno proračunavanje sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti.

Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i vrijednosti podataka proračunatih modelom dana je kao suma kvadrata odstupanja. Programski paket SCIENTIST daje i druge statističke parametre koji govore o uspješnosti procjene kao što su standardna devijacija, R^2 , korelacija te kriterij odabira modela. Također, programski paket SCIENTIST daje standardne devijacije procijenjenih parametara koje govore da se vrijednost parametra nalazi u navedenom području s 95%-tnom vjerojatnošću [39].

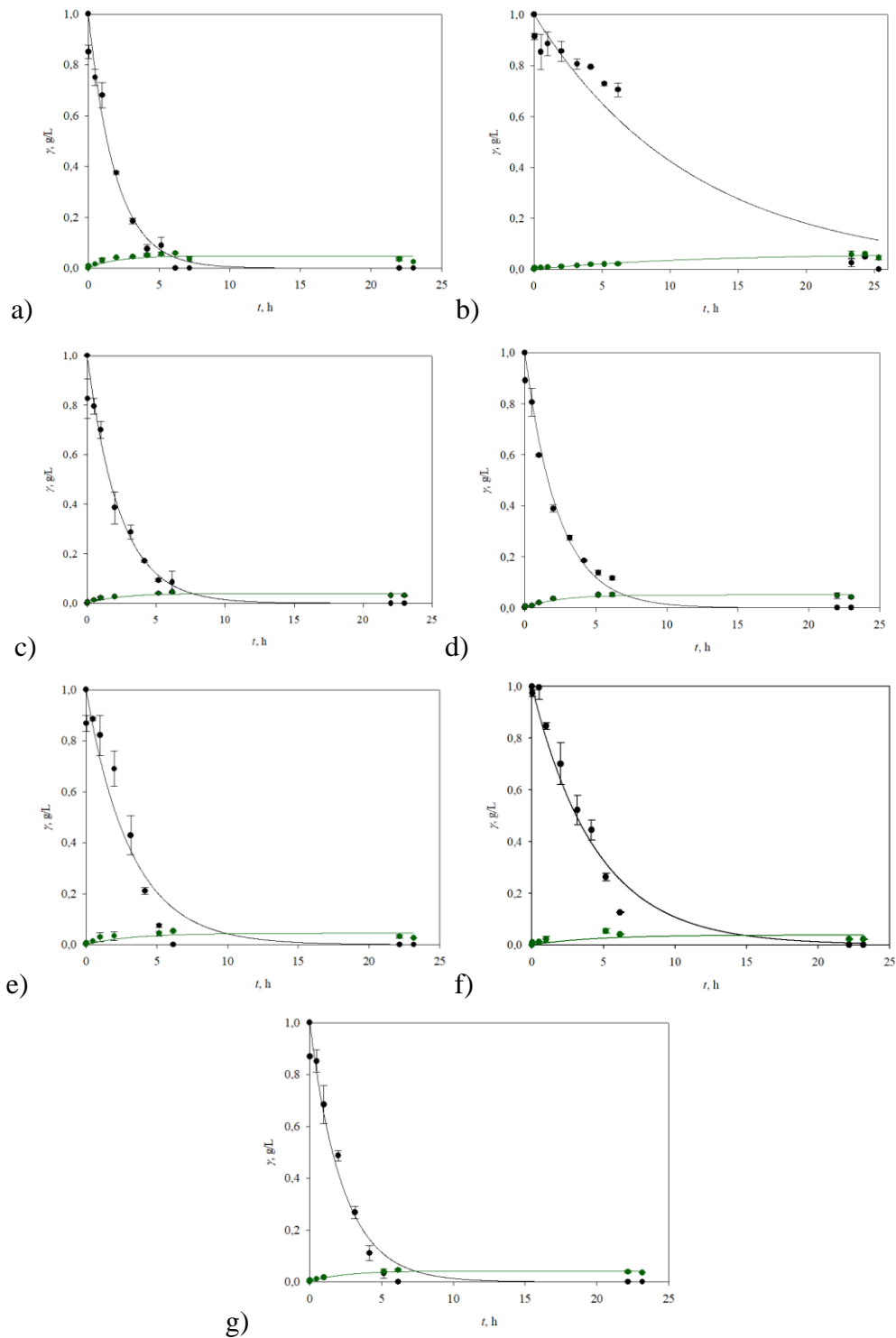
4. Rezultati i rasprava

U ovom radu provedena je fermentacija uz korištenje komercijalno dostupnih kvasaca roda *Saccharomyces* s ciljem proizvodnje bioetanola iz različitih supstrata. Na početku je proveden odabir kvasca za provedbu procesa fermentacije pri čemu su kao kriteriji odabira korišteni brzina razgradnje supstrata i količina nastalog bioetanola. Za provedbu ovog dijela istraživanja korišteno je sedam kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac, *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae* – instant kvasac, *Saccharomyces cerevisiae* – svježi kvasac, *Saccharomyces cerevisiae* + *Saccharomyces pastorianus* i *Saccharomyces cerevisiae diastaticus*). Određena je optimalna koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi za provedbu procesa u šaržnim uvjetima, a potom je fermentacija provedena u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata konstantnog protoka kako bi se intenzivirao proces, odnosno dobila veća produktivnost bioetanola. Nakon što su određeni optimalni procesni uvjeti provedena je fermentacija na enzimskom i kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa nastalom kao nusprodukt procesa proizvodnje piva.

4. 1. Fermentacija modelne otopine glukoze s cijelim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru $V = 50$ mL

U prvom dijelu istraživanja provedena su preliminarna istraživanja anaerobnog uzgoja različitih vrsta kvasca na modelnoj hranjivoj podlozi. Osnovi ciljevi ovog dijela istraživanja bili su definirati koji kvasac najbrže fermentira glukozu i daje najveću koncentraciju bioetanola na kraju provedbe procesa. Svi pokusi provedeni su s početnom koncentracijom glukoze od 1 g/L. Kako bi pospješili rast kvasca i podržali njegovu fiziološku aktivnost, tokom procesa fermentacije u podlogu je osim šećera dodan još i izvor fosfora i dušika, kvašćev ekstrakt te soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ [42]. Fosfor je prisutan u nukleinskim kiselinama i fosfolipidima te je stoga neophodan za rast svih kvasaca [43]. Osim toga dodatkom fosfora i dušika u hranjive podloge pospješuje se iskorištenje šećera te se povećava proizvodnja bioetanola. Kvašćev ekstrakt je i važan izvor peptida, aminokiselina i vitamina pa se kao posljedica njegova dodatka očekuje povećanje prinosa bioetanola [44].

Rezultati preliminarnih istraživanja fermentacije glukoze pomoću različitih kvasaca roda *Saccharomyces* prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Dinamička promjena koncentracije glukoze (●) i bioetanol (●) tijekom anaerobne fermentacije: a) *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac, b) *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac, c) *Saccharomyces cerevisiae* – instant kvasac, d) *Saccharomyces cerevisiae* – svježi kvasac, e) *Saccharomyces cerevisiae* + *Saccharomyces pastorianus*, f) *Saccharomyces cerevisiae* *diastaticus* i g) *Saccharomyces bayanus* (—) matematički model procesa)

Kao što je vidljivo iz rezultata pokusa (Slika 10.), nastanak bioetanol povezan je s potrošnjom glukoze. Za većinu kvasaca, glukoza je bila potrošena nakon 6 h provedbe fermentacije osim za vinski kvasac. Dobiveni rezultati su bili očekivani s obzirom da je vinski kvasac namijenjen za laganom fermentiranju šećera. Osim toga, tijekom alkoholne fermentacije od 1 g/L šećera trebalo bi nastati približno 0,47 g/L etanola. Iz dobivenih rezultata (Tablica 4.) vidljivo je da je koncentracija etanola postignuta u svim eksperimentima bila značajno manja (približno deset puta). Niže koncentracije etanola su također očekivane jer je u podlozi na početku provedbe procesa fermentacije bilo otopljenog kisika pa je glukoza u početku provedbe procesa primarno potrošena za rast stanica kvasca, a ne za fermentaciju u bioetanol.

S obzirom da je koncentracija etanola u svim pokusima, bez obzira na vrstu korištenog kvasca bila približno slična, izbor kvasaca za provedbu daljnjih istraživanja proveden je na temelju brzine potrošnje glukoze. U Tablici 4. prikazan je pregled karakterističnih procesnih veličina korištenih pri analizi fermentacije glukoze provedenoj s različitim kvascima.

Tablica 4. Brzina potrošnje glukoze i masena koncentracija bioetanol na kraju procesa

Kvasac	Vrijeme provedbe reakcije, h	Masena koncentracija bioetanol, g/L	k , g/(L·h)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – suhi kvasac	6,17	0,059±0,001	0,516±0,030
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> – vinski kvasac	24,33	0,060±0,007	0,086±0,008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – instant kvasac	6,17	0,046±0,003	0,425±0,024
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – svježi kvasac	6,17	0,051±0,005	0,425±0,018
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Saccharomyces pastorianus</i>	6,17	0,053±0,001	0,316±0,029
<i>Saccharomyces cerevisiae diastaticus</i>	5,17	0,054±0,006	0,223±0,014
<i>Saccharomyces bayanus</i>	6,17	0,045±0,003	0,434±0,027

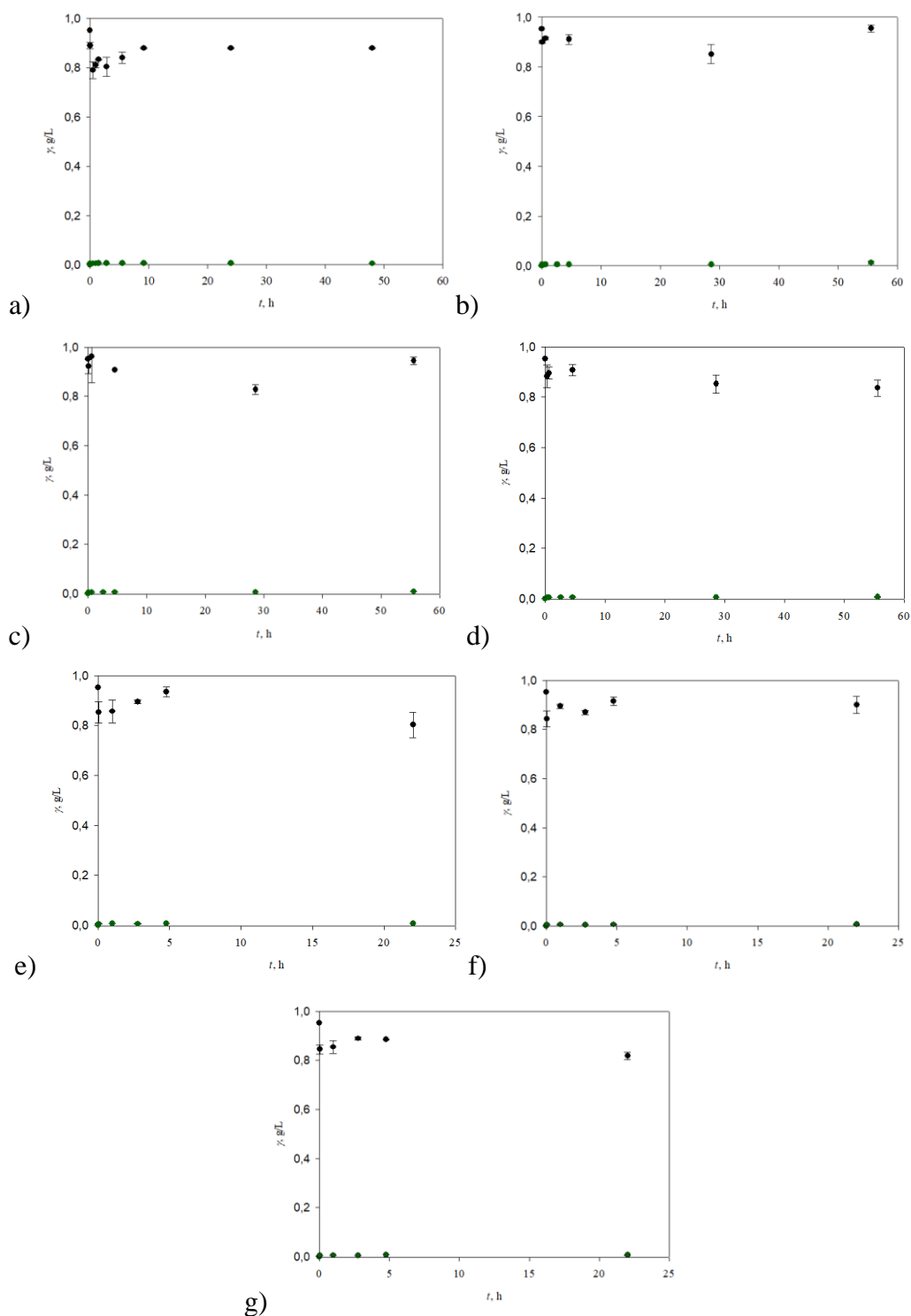
Na temelju procijenjenih brzina potrošnje glukoze pokazano je da suhi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najbrže troši glukozu ($0,516 \pm 0,030 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$). Instant i svježi oblik istog kvasca odlikuje nešto sporija brzina potrošnje glukoze iako je kod ovih tipova kvasaca brzina potrošnje glukoze nešto veća nego je ona kod većine drugih analiziranih sojeva. Najmanja brzina potrošnje glukoze karakteristika je vinskog kvasca što je u skladu s poznatim svojstvima ovog kvasca.

S obzirom na dobivene rezultate odlučeno je da će se u nastavku istraživanja koristiti suhi kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, ali i vinski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*. Razlog tome je što je taj kvasac najtolerantniji na visoke koncentracije etanola u usporedbi s ostalim testiranim sojeva.

4. 2. Fermentacija glukoze s permeabiliziranim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru V = 50 mL

Nakon provedbe procesa fermentacije s cijelim stanicama kvasca, provedena je fermentacija korištenjem permeabiliziranih stanica kvasca kako bi se ispitalo može li se njihovim korištenjem poboljšati učinkovitost i produktivnost bioprocesa. Naime, korištenje cijelih stanica u bioprocima ima određene nedostatke. Osnovni je povezan s otporima koji se javljaju pri prijenosu tvari kroz membranu iz okoline u stanicu i iz stanice u okolinu što značajno usporava proces [45]. Cijele stanice pekarskog kvasca zbog toga odlikuje niska aktivnost. Uz to, proces koji se provodi s cijelim stanicama je često kompliciraniji jer stanice treba održavati aktivnima [46]. Zbog svega toga se koriste različiti postupci kako bi se permeabilizirala stanična stijenka, te time smanjio otpor prijenosu tvari za supstrat i produkt te povećala aktivnost enzima u stanicama. Jedan od često korištenih postupaka permeabilizacije je obrada površine stanica s aktivnim tvarima kao što je to primjerice detergent CTAB.

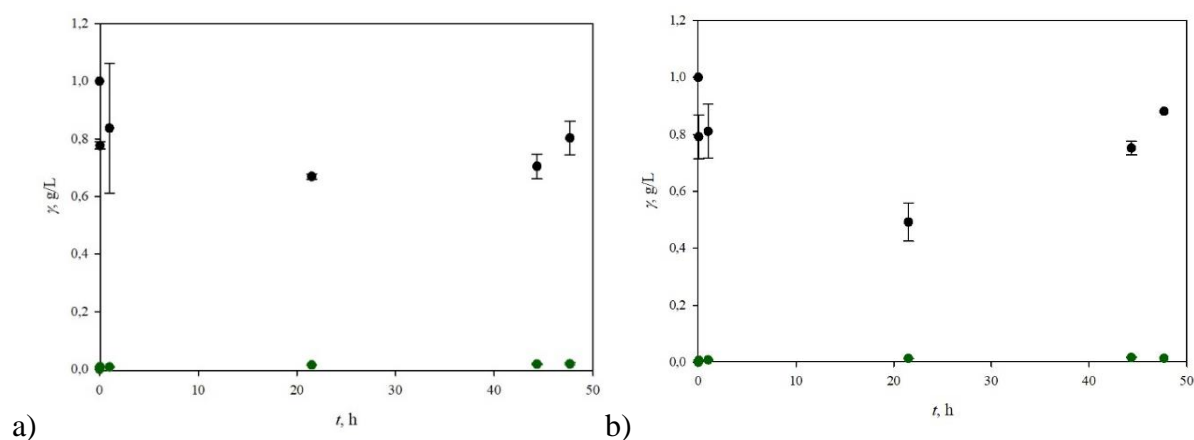
U okviru provedenih istraživanja analiziran je proces proizvodnje bioetanola permeabiliziranim stanicama kvasca pri čemu je kao izvor šećera korištena modelna hranjiva podloga u kojoj je koncentracija glukoze bila $1 \text{ g}/\text{L}$. Rezultati procesa proizvodnje bioetanola provedeni uz prisustvo permeabiliziranih stanica kvasca prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Dinamička promjena koncentracije glukoze (●) i bioetanola (●) tijekom procesa proizvodnje bioetanola permeabiliziranim stanicama kvasca koncentracije $\gamma = 1$ g/L: a) *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac, b) *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac, c) *Saccharomyces cerevisiae* – instant kvasac, d) *Saccharomyces cerevisiae* – svježi kvasac, e) *Saccharomyces cerevisiae* + *Saccharomyces pastorianus*, f) *Saccharomyces cerevisiae diastaticus* i g) *Saccharomyces bayanus*

Kao što se može vidjeti iz rezultata pokusa (Slika 11.), masena koncentracija glukoze se nije značajno promijenila tijekom provedbe procesa te je posljedično koncentracija bioetanola koja je tijekom procesa nastala bila zanemariva.

Uzrok malih količina bioetanola nastalog u procesu provedenom s permeabiliziranim stanicama kvasca vjerojatno je posljedica male količine enzima odgovornih za nastanak etanola koji su bili prisutni u stanicama kvasca. Stoga je u nastavku istraživanja koncentracija permeabiliziranih stanica povećana s 1 g/L na 10 g/L, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 12.



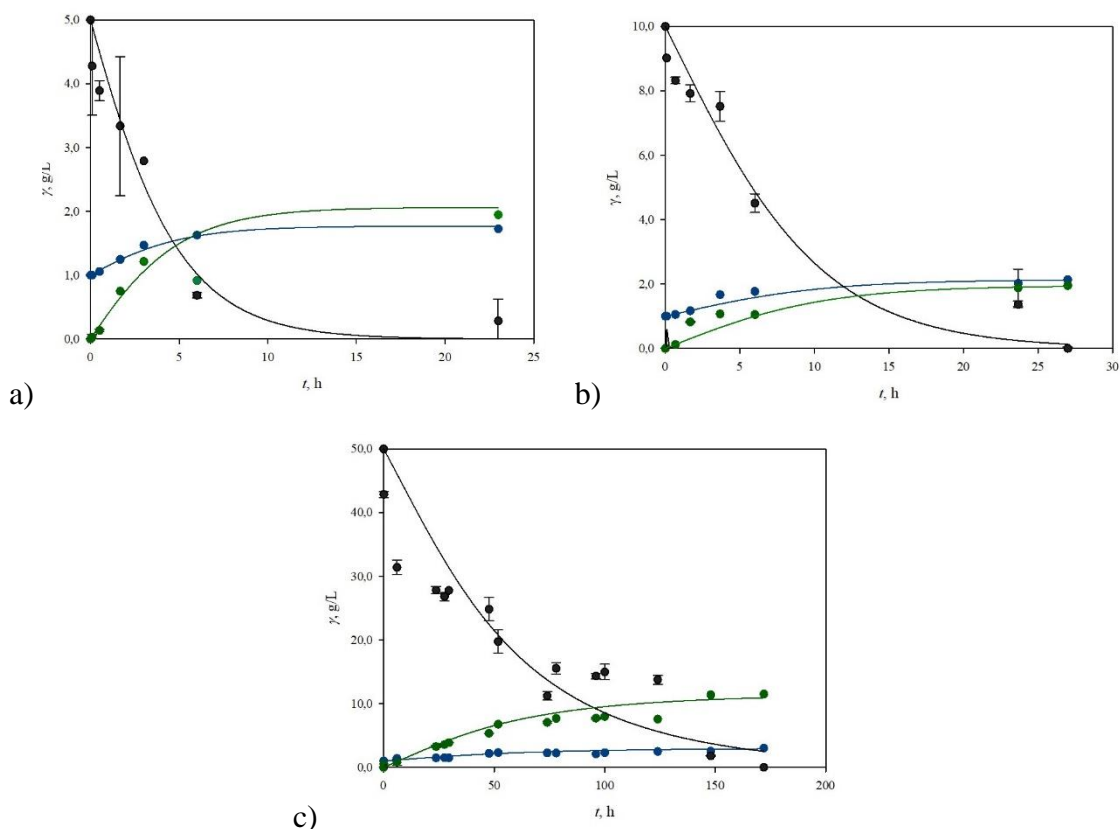
Slika 12. Dinamička promjena koncentracije glukoze (●) i bioetanola (●) tijekom procesa proizvodnje bioetanola permeabiliziranim stanicama kvasca koncentracije $\gamma = 10$ g/L: a) *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac b) *Saccharomyces cerevisiae* var. bayanus – vinski kvasac

Iz rezultata provedenih pokusa vidljivo je da povećanje koncentracije stanica kvasaca nema pozitivan utjecaj na proizvodnju bioetanola. Uzrok tome je vjerojatno nedostatak koenzima NADH i ATP u hranjivoj podlozi koji su neophodni za biotransformaciju glukoze u etanol. U radu Takeshigo i Ouchi [47], autori navode kako je u podlogu s permeabiliziranim stanicama potrebno dodati ATP, NAD⁺, magnezij i anorganski fosfat kako bi se inicirala fermentacija bioetanola. Međutim, zbog visokih cijena koenzima proces proizvodnje bioetanola permeabiliziranim stanicama kvasca ne bi bio ekonomski opravdan.

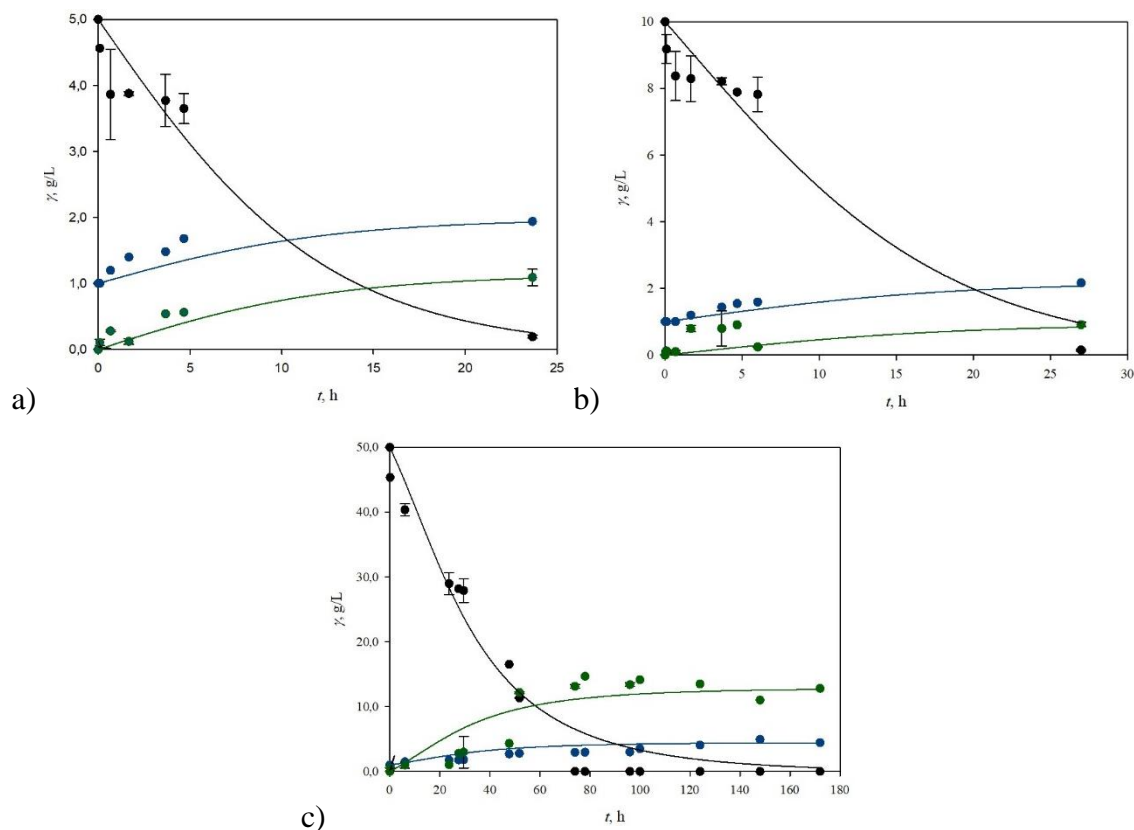
4. 3. Ispitivanje utjecaja početne koncentracije glukoze na produktivnost procesa

U preliminarnim istraživanjima odabrana su dva kvasca: *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac i *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac koji su korišteni u nastavku istraživanju.

Kao što je prethodno navedeno, tijekom alkoholne fermentacije glukoze početne koncentracije 1 g/L trebalo bi u konačnici nastati približno 0,47 g/L bioetanola. Kako bi se ispitaio utjecaj početne koncentracije glukoze na učinkovitost i produktivnost procesa, provedeni su pokusi s različitim početnim koncentracijama glukoze (5 g/L, 10 g/L i 50 g/L glukoze). Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 13. i 14. za *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac i *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac.



Slika 13. Dinamička promjena koncentracije biomase (●), bioetanola (●) i glukoze (●) tijekom anaerobne fermentacije *Saccharomyces cerevisiae* - suhi kvasac za različite početne koncentracije glukoze : a) 5 g/L, b) 10 g/L, c) 50 g/L, (—) matematički model procesa)



Slika 14. Dinamička promjena koncentracije biomase (●), bioetanola (●) i glukoze (●) tijekom anaerobne fermentacije *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac za različite početne koncentracije glukoze : a) 5 g/L, b) 10 g/L, c) 50 g/L, ((—) matematički model procesa)

Tablica 5. Brzina potrošnje glukoze za *S. cerevisiae* – suhi kvasac i *S. cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac tijekom anaerobne fermentacije pri različitim početnim koncentracijama glukoze

	γ_G , g/L	k , g/(L·h)
<i>S. cerevisiae</i> - suhi kvasac	5	2,770
	10	0,915
	50	0,753
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> - vinski kvasac	5	0,748
	10	0,487
	50	0,335

Iz rezultata provedenih pokusa vidljivo je da potrošnju glukoze slijedi povećanje koncentracije etanola (Slika 13. i 14.). Brzina potrošnje glukoze (Tablica 5.) i koncentracije etanola veće su u pokusu provedenom sa suhim kvascem. Maksimalna koncentracija etanola

(Slika 13. i 14.) u pokusu provedenom sa suhim kvascem i početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 5$ g/L iznosila je $\gamma_E = 1,946 \pm 0,014$ g/L, a u pokusu provedenom s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 10$ g/L iznosila je $\gamma_E = 1,950 \pm 0,035$ g/L. U pokusu provedenom s vinskim kvascem za iste početne koncentracije glukoze maksimalne koncentracije etanola bile su $\gamma_E = 1,091 \pm 0,124$ g/L, odnosno $\gamma_E = 0,911 \pm 0,066$ g/L. Najveće koncentracije bioetanola postignute su u pokusima provedenim pri početnoj koncentraciji glukoze $\gamma_G = 50$ g/L pri čemu je kod fermentacije provedene u prisustvu suhog kvasca postignuta koncentracija etanola $\gamma_E = 11,504 \pm 0,101$ g/L, dok je u pokusu provedenom s vinskim kvascem koncentracija etanola bila $\gamma_E = 12,801 \pm 0,099$ g/L. Svi pokusi provedeni su na način da je fermentacija prekinuta kada je koncentracija glukoze pala na nulu. Relativno dugo trajanje procesa fermentacije svim prethodno opisanim pokusima vjerojatno je posljedica niske početne koncentracije biomase kvasca kojemu je trebalo više vremena da potroši raspoloživu glukozu za rast i održavanje stanica kvasca te za proizvodnju etanola. Za dodatnu usporedbu provedenih pokusa izračunati su pokazatelji uspješnosti procesa koji su prikazani u Tablici 6. Budući da je cilj proizvodnje bioetanola razviti ekonomski isplativ proces, odnosno proizvesti visoku koncentraciju bioetanola u kratkom vremenu, produktivnost bioetanola (masa bioetanola u jedinici vremena i jedinici volumena) je postavljena kao glavni kriterij odabira sustava s kojim su provedena daljnja istraživanja.

Tablica 6. Pokazatelji uspješnosti šaržne fermentacije provedene sa suhim i vinskim kvascem

	γ_G , g/L	Y_P , g/L	$Y_{X/S}$, g/g	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
<i>S. cerevisiae</i> - suhi kvasac	5	1,946±0,014	0,154±0,006	0,413±0,003	80,668±0,561	0,085±0,001
	10	1,950±0,035	0,114±0,001	0,195±0,003	38,135±0,491	0,072±0,001
	50	11,504±0,101	0,040±0,001	0,230±0,002	44,995±0,397	0,067±0,001
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> - vinski kvasac	5	1,091±0,124	0,196±0,001	0,227±0,026	44,375±5,024	0,046±0,005
	10	0,911±0,066	0,118±0,001	0,092±0,007	18,081±1,303	0,034±0,002
	50	12,801±0,099	0,069±0,002	0,256±0,002	50,059±0,143	0,074±0,001

Kako bi opisali dinamiku procesa postavljen je matematički model. Iz rezultata prethodno provedenih pokusa (Slike 13. i 14.) procijenjeni su kinetički parametri Monodovog modela: μ_{\max} (maksimalna specifična brzina rasta stanica kvasaca) i K_s (konstanta zasićenja) korištenjem Jednadžbi 10, 11, 12 i 20 (Prilog 6.), a procijenjene vrijednosti za oba kvasca prikazane su u Tablici 7.

Tablica 7. Procijenjene vrijednosti parametara K_s i μ_{\max} za suhi i vinski kvasac za pokuse provedene pri različitim početnim koncentracijama glukoze

	K_s , g/L	μ_{\max} , 1/h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - suhi kvasac, 5,0 g/L	12,602	0,502
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - suhi kvasac, 10,0 g/L	12,602	0,222
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - suhi kvasac, 50,0 g/L	12,602	0,022
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> - vinski kvasac, 5,0 g/L	21,616	0,401
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> - vinski kvasac, 10,0 g/L	21,616	0,181
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> - vinski kvasac, 50,0 g/L	21,616	0,060

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da koncentracija glukoze utječe na kinetiku rasta te se može zaključiti da se μ_{\max} smanjuje povećanjem koncentracije glukoze pri istoj početnoj koncentraciji stanica. U pokusima provedenim sa suhim kvascem najveća vrijednost $\mu_{\max} = 0,502$ 1/h dobivena je u pokusu provedenom s početnom masenom koncentracijom glukoze od 5,0 g/L, dok je najmanja vrijednost $\mu_{\max} = 0,022$ 1/h dobivena u pokusu provedenom s početnom masenom koncentracijom glukoze od 50 g/L. Slično vrijedi i za vinski kvasac gdje je najveća vrijednost $\mu_{\max} = 0,401$ 1/h postignuta pri početnoj koncentraciji glukoze od 5 g/L. Budući da su najveća produktivnost ($0,085 \pm 0,001$ g/(L·h)) i najveći μ_{\max} (0,502 1/h) dobiveni u pokusu provedenom sa suhim kvascem pri početnoj koncentraciji glukoze 5 g/L glukoze, procesni uvjeti korišteni u ovom pokusu odabrani su za provedbu fermentacije u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata s ciljem intenzifikacije procesa, odnosno postizanja veće produktivnosti.

4. 4. Šaržna fermentacija s dotokom supstrata

Kako je prethodno navedeno, daljnja istraživanja provedena su sa suhim kvascem i pri početnoj koncentraciji glukoze u hranjivoj podlozi od 5 g/L. Iz rezultata pokusa prikazanih na Slici 13a. vidljivo je da se u prvih 2,5 sati provedbe fermentacije glukoza troši najbrže te je u tom trenutku njena koncentracija približno jednaka polovici početne vrijednosti. Stoga je izračunata prosječna brzina potrošnje glukoze u prva 2,5 sata provedbe pokusa koja je iznosila približno 0,5 g/(L·h). Na temelju izračunate prosječne brzine potrošnje i koncentracije glukoze u toku svježeg supstrata (200 g/L), izračunat je pomoću Jednadžbi 22 i 23 protok toka svježeg supstrata ($q_v^{UL} = 21 \mu\text{L}/\text{min}$) koji je kontinuirano dovođen u reaktor do kraja pokusa.

volumen reakcijske posude · brzina potrošnje glukoze = količina potrebne glukoze

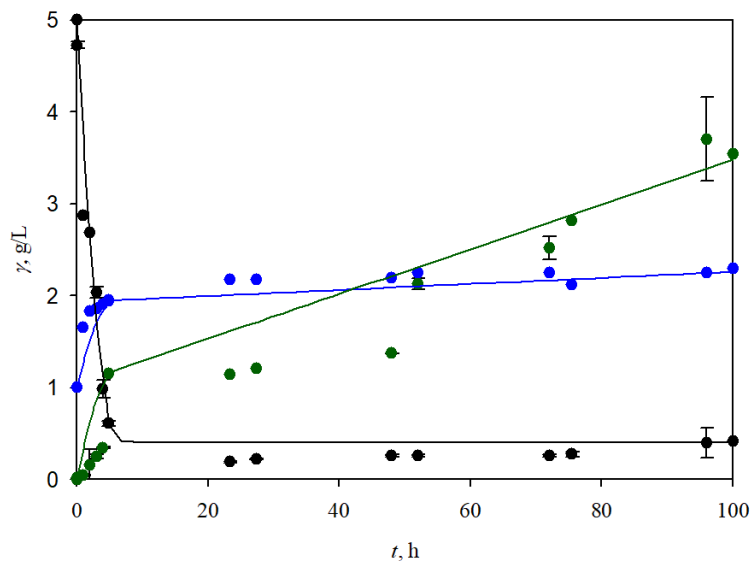
$$0,5 \text{ L} \cdot 0,5 \frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}} = 0,25 \frac{\text{g}}{\text{h}} \text{ glukoze} \quad (22)$$

$$\frac{\text{brzina potrošnje glukoze}}{\text{masena koncentracija pripremljene otopine glukoze za dopremu}}$$

= protok toka svježe sirovine

$$\frac{0,25 \text{ g/h}}{200 \text{ g/L}} = 0,00125 \frac{\text{L}}{\text{h}} = 1,25 \frac{\text{L}}{\text{h}} = 21 \mu\text{L}/\text{min} \quad (23)$$

Dotok supstrata uključen je nakon 5. sata provedbe pokusa kada je koncentracija glukoze pala ispod 1 g/L. Dodatak svježeg supstrata rezultirao je nastavkom proizvodnje bioetanola. Dinamička promjena koncentracije etanola, biomase i glukoze prikazani su na Slici 15., a simulacije matematičkog modela procesa provedene su korištenjem programskog koda prikazanog u Prilogu 7.



Slika 15. Dinamička promjena koncentracije biomase (●), bioetanola (●) i glukoze (●) za šaržnu fermentaciju s dotokom svježeg supstrata provedenu sa *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac pri $q_v^{UL} = 21 \mu\text{L}/\text{min}$ (— matematički model procesa)

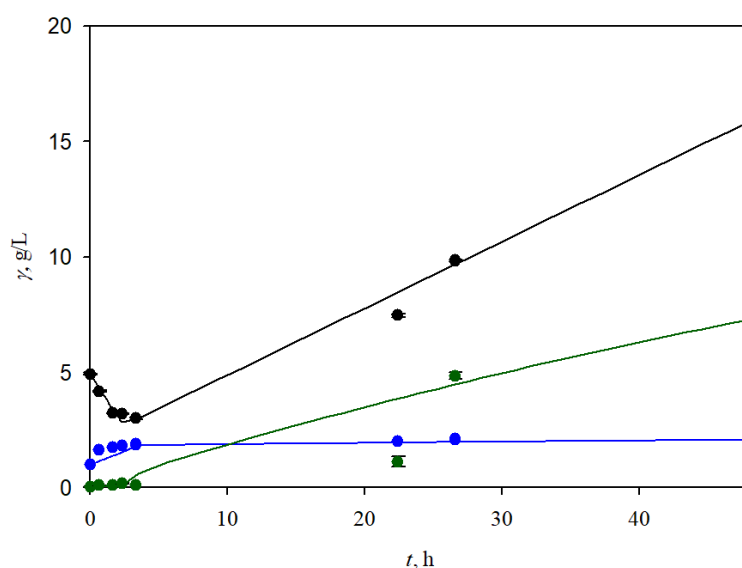
U prvih 5 sati provedbe pokusa nastala je mala koncentracija bioetanola jer je zbog prisutnog otopljenog kisika u podlozi kvasac primarno koristio glukozu za rast. Navedeno se može vidjeti iz povećanja masene koncentracije kvasca u tom periodu provedbe pokusa. Nakon 5. sata rast kvasaca se usporava, a započinje proces alkoholnog vrenja tj. proizvodnja bioetanola. Kao što je vidljivo iz rezultata pokusa prikazanih na Slici 15., koncentracija bioetanola u dijelu pokusa koji je proveden s dotokom svježeg supstrata linearno raste i postiže maksimalnu vrijednosti od $3,703 \pm 0,457 \text{ g/L}$ nakon 96. sata. Nakon 100 sati provedbe reakcije, koncentracija etanola i biomase je počela padati, a glukoze rasti. To je vjerojatno povezano s prelaskom iz proizvodne faze u fazu odumiranja stanica kvasca u kojoj se potrošnja glukoze značajno smanjuje. U Tablici 8. prikazani su pokazatelji učinkovitosti šaržne fermentacije s dotokom supstrata.

Tablica 8. Pokazatelji učinkovitosti šaržne fermentacije s dotokom supstrata ($q_v^{UL} = 21 \mu\text{L}/\text{min}$)

$Y_P, \text{g/L}$	$Y_{X/S}, \text{g/g}$	$Y_{P/S}, \text{g/g}$	$E, \%$	$Pr, \text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$
$3,547 \pm 0,052$	$0,025 \pm 0,001$	$0,067 \pm 0,001$	$13,191 \pm 0,193$	$0,035 \pm 0,001$

Prema izračunatim pokazateljima učinkovitosti bioprocesa vidljivo je da šaržna fermentacija s dotokom supstrata (Tablica 8.) nije rezultirala povećanjem učinkovitosti i produktivnosti procesa u odnosu na šaržnu fermentaciju (Tablica 6.), stoga je potrebna daljnja optimizacija provedbe procesa s dotokom supstrata.

S obzirom na niske produktivnost i učinkovitost procesa u nastavku istraživanja provedena je šaržna fermentacija s dotokom svježeg supstrata u kojoj je protok ulaznog toka povećan dva puta te je iznosio 42 $\mu\text{L}/\text{min}$. Dinamička promjena koncentracije glukoze, etanola i biomase prikazana je na Slici 16.



Slika 16. Dinamička promjena koncentracije biomase (●), bioetanola (●) i glukoze (●) za šaržnu fermentaciju s dotokom svježeg supstrata provedenu sa *Saccharomyces cerevisiae* – suhi kvasac pri $q_v^{\text{UL}} = 42 \mu\text{L}/\text{min}$ ((—) matematički model procesa)

U slučaju dva puta većeg protoka glukoze u ulaznom toku fermentacija je trajala znatno kraće te se glukoza počela akumulirati u sustavu već nakon 24 sata pri čemu se koncentracija biomase nije značajnije mijenjala dok je koncentracija etanola linearno rasla. Maksimalna dobivena koncentracija etanola u ovom pokusu bila je $8,195 \pm 0,195 \text{ g/L}$ što je znatno više nego u pokusu provedenom s protokom glukoze od $q_v^{\text{UL}} = 21 \mu\text{L}/\text{min}$. U Tablici 9. prikazani su pokazatelji učinkovitosti za šaržnu fermentaciju s dotokom supstrata u kojoj je protok ulaznog toka bio $q_v^{\text{UL}} = 42 \mu\text{L}/\text{min}$.

Tablica 9. Pokazatelji učinkovitosti šaržne fermentacije s dotokom supstrata ($q_v^{UL} = 42 \mu\text{L}/\text{min}$)

$Y_p, \text{g/L}$	$Y_{x/s}, \text{g/g}$	$Y_{p/s}, \text{g/g}$	$E, \%$	$Pr, \text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$
$8,195\pm 0,195$	$0,033\pm 0,001$	$0,243\pm 0,001$	$47,580\pm 0,205$	$0,171\pm 0,004$

Iz izračunatih pokazatelja učinkovitosti (Tablica 9.) vidljivo je da su koncentracija produkta $y_p = 8,195\pm 0,195 \text{ g/L}$, koeficijent iskorištenja etanola na glukozi $Y_{p/s} = 0,243\pm 0,001 \text{ g/g}$, učinkovitost $E = 47,580\pm 0,205 \%$ i produktivnost $Pr = 0,171\pm 0,004 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ znatno veći nego u pokusu provedenom s manjim protokom ulaznog toka (Tablica 8.). Usprkos tome, dobivene vrijednosti su i dalje nedostatne za ekonomski opravdanu proizvodnju bioetanola. S obzirom na rezultate svih provedenih pokusa nastavak istraživanja te uzimajući u obzir jednostavnost izvedbe šaržnog procesa, u nastavku istraživanja proces proizvodnje bioetanola proveden je korištenjem hidrolizata pivskog tropa fermentacijom u šaržnom reaktoru.

4. 5. Šaržna fermentacija na hidrolizatu pivskog tropa

Prema literaturno dostupnim podacima [22, 23], najčešći prosječni sastav pivskog tropa (% suhe tvari) je: celuloza (25,4%), hemiceluloza (21,8%), lignin (11,9%), proteini (24%), lipidi (10,6%), pepeo (2,4%) dok ostatak čine sporedne komponente poput ferulinske kiseline, kumarske kiseline itd. Visoki udio polisaharida u pivskom tropu čini ga zanimljivim supstratom za proizvodnju bioetanola. Prilikom korištenja lignocelulozne sirovine u proizvodnji biogoriva potrebna je njezina priprema kako bi se izdvojio lignin, a celuloza i hemiceluloza razgradile na jednostavnije šećere [48].

U okviru provedenih istraživanja provedene su dvije vrste hidrolize pivskog tropa. Prvi postupak uključivao je enzimsku hidrolizu uz korištenje gljive *T. lanuginosus*. Nakon 7 dana provedbe pokusa dobiven je hidrolizat u kojem je koncentracija ukupnih reducirajućih šećera u steriliziranim hidrolizatima iznosila 0,5 mg/mL, dok je u nesteriliziranim uzorcima iznosila 1 mg/mL. Dobivena količina šećera bila je izrazito niska te je odlučeno da se ovaj hidrolizat neće koristiti u daljnjim istraživanjima.

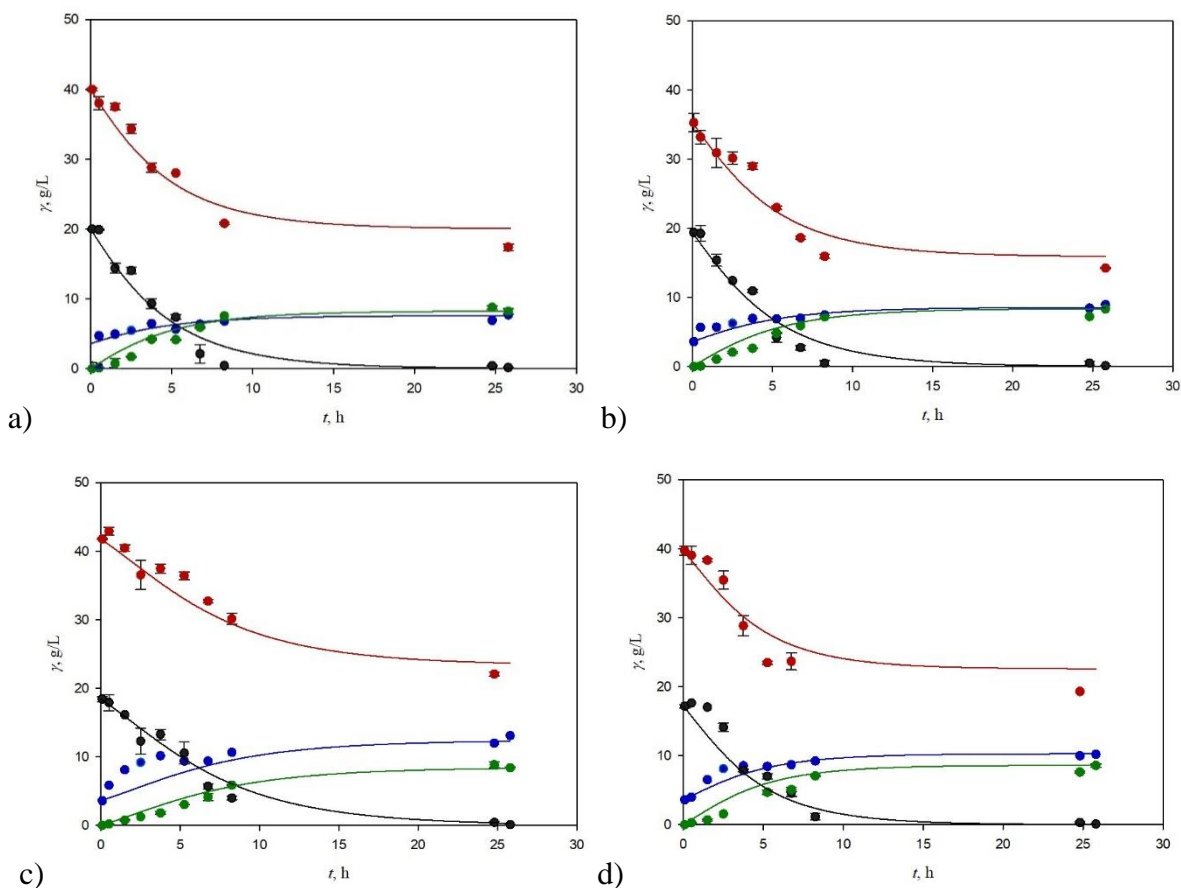
Drugi postupak hidrolize pivskog tropa proveden je djelovanjem kiselina. Nakon obrade pivskog tropa kiselinskom hidrolizom dobiven je hidrolizat čiji je sastav (maseni udio, w/w) prikazan u Tablici 10. Dobiveni hidrolizat sadržavao je najviše glukoze (60,61%), zatim

ksiloze (26,16%) i arabinoze (13,21%). Osim ugljikohidrata, u uzorcima su bile prisutne i organske kiseline tj. mravlja i octena kiselina.

Tablica 10. Rezultati UPLC analize – masena koncentracija (g/L) prisutnih komponenata

Tvar	γ , g/L	w, %
Šećeri		
Glukoza	18,30	60,61
Ksilozna	7,90	26,16
Arabinoza	3,99	13,21
Kiseline		
Mravlja kiselina	1,45	
Octena kiselina	1,60	

Treba napomenuti kako hidrolizati mogu sadržavati različite toksične tvari koje mogu inhibicijski djelovati na rast kvasaca [49]. Zbog toga je dio dobivenog hidrolizata tretiran s aktivnim ugljenom kako bi se uklonili potencijalno štetni spojevi (detoksifikacija pivskog tropa). Također, nakon kiselinske hidrolize, pH tropa iznosio je 1,9. Kako bi se pH podesio na 5,8 koji je optimalan za provedbu fermentacije, uzorci su tretirani na dva načina, dodatkom NaOH ili dodatkom $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Dodatak $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bi osim povećanja pH mogao rezultirati uklanjanjem nekih spojeva koji su prisutni u pivskom tropu, a nepoželjni su za fermentaciju, na način da se absorbiraju na $\text{Ca}(\text{OH})_2$ te uklone iz supstrata taloženjem. Dinamička promjena koncentracije biomase, bioetanol, glukoze i ukupnih šećera tijekom fermentacije pivskog tropa pripremljenog na četiri prethodno opisana načina prikazana je na Slici 17. Za simulaciju matematičkog modela procesa korišten je programski kod prikazan u Prilogu 8. U Prilogu 9. prikazani su dobiveni kromatogrami GC analize uzoraka prikupljenih u različitim vremenima fermentacije provedenom s hidrolizatom pivskog tropa tretiranog s NaOH.



Slika 17. Dinamička promjena koncentracije biomase (●), bioetanol (●) glukoze (●) i ukupnih šećera (●) za kiselinski hidrolizat pivskog tropa tretiran s a) NaOH, b) aktivnim ugljenom i NaOH, c) Ca(OH)₂, d) aktivnim ugljenom i Ca(OH)₂ (— matematički model procesa)

Kao što je vidljivo iz rezultata pokusa (Slika 17.), potrošnja ukupnih šećera se u svim slučajevima podudara s ukupnom potrošnjom glukoze s obzirom na to da *Saccharomyces cerevisiae* ne fermentira ostale šećere prisutne u hidrolizatu (pentoze, arabinozu i ksilozu). Većina glukoze potrošena je unutar prvih 10 sati provedbe procesa. Nakon toga, primijećen je lagani pad koncentracije ukupnih šećera, što može biti posljedica prisutnosti drugih heksoza u hidrolizatu koje nisu detektirane na UPLC. Koncentracija biomase je rasla prvih 2,5 sata što je vjerojatno posljedica prisutnosti otopljenog kisika. U tom periodu, proizvodnja bioetanol bila je niska. Nakon što je kisik potrošen, započinje alkoholno vrenje te se povećava koncentracija bioetanol. Maksimalne koncentracije bioetanol postignute u pokusima provedenim sa svim hidrolizatima su bile slične te su redom iznosile 8,192±0,251 g/L (a), 8,335±0,015 g/L (b), 8,403±0,114 g/L (c) i 8,576±0,247 g/L (d). U Tablici 11. prikazani su pokazatelji uspješnosti procesa koji omogućuju usporedbu pokusa provedenih na različite načine pripremljenim kiselinskim hidrolizatima.

Tablica 11. Pokazatelji učinkovitosti šaržne fermentacije provedene s kiselinskim hidrolizatom pivskog tropa

Sustav	Y_P , g/L	$Y_{X/S}$, g/g	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
NaOH	8,192±0,251	0,199±0,015	0,413±0,013	80,788±2,472	0,318±0,010
Aktivni ugljen + NaOH	8,335±0,015	0,272±0,010	0,433±0,001	84,617±0,152	0,323±0,001
Ca(OH) ₂	8,403±0,114	0,478±0,001	0,459±0,006	89,662±1,124	0,326±0,004
Aktivni ugljen + Ca(OH) ₂	8,576±0,247	0,389±0,002	0,502±0,014	98,148±2,829	0,332±0,010

Prema pokazateljima uspješnosti procesa nešto višu učinkovitost i produktivnost imaju kiselinski hidrolizati tretirani aktivnim ugljenom što se može objasniti time da je aktivni ugljen vjerojatno vezao neke od sporednih komponenata prisutnih u hidrolizatu koje mogu djelovati kao inhibitori. U slučaju kiselinskog hidrolizata tretiranog aktivnim ugljenom i Ca(OH)₂ (Slika 17d.) na početku provedbe procesa glukoza se sporije trošila, odnosno kvascu je bilo potrebno dulje vrijeme za prilagodbu, međutim ovaj sustav pokazao je visoku učinkovitost $E = 98,148 \pm 2,829\%$ i produktivnosti $Pr = 0,332 \pm 0,010$ g/(L·h). Dobiveni rezultati pokazuju potencijal proizvodnje etanola fermentacijom hidrolizata pivskog tropa. Kada se navedenom doda da je proces proveden s jeftinim i lako dostupnim suhim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* jasan je potencijal provedenih istraživanja. Uz optimiranje uvjeta provedbe procesa, dodatna je intenzifikacija moguća korištenjem genetski modificiranih kvasaca koji razgrađuju i pentoze prisutne u hidrolizatu te uklanjanjem inhibitora kao što su octena i mravlja kiselina iz fermentacijskog medija.

5. Zaključak

Iz rezultata provedenih pokusa može se zaključiti sljedeće:

- Preliminarnim ispitivanjima definiran je kvasac koji šaržnom fermentacijom u procesu provedenom s cijelim stanicama proizvodi najveću koncentraciju bioetanol. Od 7 ispitanih kvasaca, na temelju izračunatih brzina reakcije, utvrđeno je da je u pokusu provedenom sa suhim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* brzina potrošnje glukoze najveća ($0,516 \pm 0,030$ g/(L·h)) uz istovremenu visoku koncentraciju nastalog etanola od $0,059 \pm 0,001$ g/L. Kvasac kojega je odlikovala najmanja brzina potrošnje glukoze bio je vinski kvasac, ali je korištenjem ovog kvasca postignuta najveća masena koncentracija etanola na kraju provedbe šaržnog procesa od $0,060 \pm 0,007$ g/L. Stoga je vinski kvasac, uz suhi kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, korišten u daljnjem istraživanju.
- Provedba procesa fermentacije s permeabiliziranim stanicama kvasca u šaržnom reaktoru na modelnoj hranjivoj podlozi rezultirala je minimalnom promjenom početne koncentracije glukoze tijekom provedbe pokusa i posljedično zanemarivim koncentracijama etanola. Navedeno je posljedica nedostatka koenzima NADH i ATP u reakcijskom mediju.
- Najveća produktivnost $Pr = 0,085 \pm 0,001$ g/(L·h) i najveći $\mu_{\max} = 0,502$ 1/h dobiveni su za fermentaciju provedenu sa suhim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* u pokusu u kojemu je početna koncentracija glukoze bila 5 g/L.
- Šaržna fermentacija s dotokom supstrata nije rezultirala povećanjem učinkovitosti i produktivnosti, odnosno intenzifikacijom procesa.
- Provedbom šaržnog procesa fermentacije na kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa tretiranog s NaOH, aktivnim ugljenom i NaOH, Ca(OH)₂ te aktivnim ugljenom i Ca(OH)₂ rezultirala je približno istim koncentracijama etanola, učinkovitostima procesa i produktivnostima. Najviša produktivnost $Pr = 0,332 \pm 0,010$ g/(L·h) i učinkovitost $E = 98,148 \pm 2,829\%$ postignuta je u sustavu u kojemu je pivski trop prije fermentacije tretiran s aktivnim ugljenom i Ca(OH)₂.
- Pokazano je da se primjenom realnog uzorka dobivenog iz otpadnog materijala te korištenjem jeftinog i dostupnog kvasca može provesti učinkovita proizvodnja etanola. Daljnjim optimiranjem procesnih uvjeta i korištenjem genetički modificiranih kvasaca mogu se postići pokazatelji uspješnosti procesa koji će osigurati ekonomski opravdanu proizvodnju etanola fermentacijom.

6. Zahvale

Zahvaljujemo mentorici doc. dr. sc. Aniti Šalić na pruženoj prilici za izradu ovog rada, vodstvu, prenesenom znanju i svim savjetima tijekom provedbe ovog rada. Hvala Vam na svakoj pomoći kada je god bila potrebna i što ste imali strpljenja za sva pitanja i objašnjenja.

Također zahvaljujemo prof. dr. sc. Bruni Zeliću na savjetima za provedbu eksperimenta, na smjernicama za pisanje ovog rada te na korekcijama samog izvještaja.

Ovaj rad je financiran sredstvima Europskih strukturnih i investicijskih fondova u okviru projekta Biokonverzija lignoceluloznog materijala u visokovrijednu hranu za životinje (KK.01.1.1.04.0107).

7. Literatura

- [1] URL: https://unfccc.int/kyoto_protocol (pristup 5.6.2022.)
- [2] URL: <https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement/the-paris-agreement> (pristup 5.6.2022.)
- [3] J. L. Ramos, M. Valdivia, F. García-Lorente, A. Segura, Benefits and perspectives on the use of biofuels, *Microb. Biotechnol.* 9 (2016) 436–440.
- [4] S. H. M. Azhara, R. Abdullaa, S. A. Jamboa, H. Mrbawia, J. A. Gansaua, A. A. M. Faika, K. F. Rodriguesc, Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, *Biochem. Biophys. Reports* 10 (2017) 52–61.
- [5] P. Binod, R. Sindhu, A. Pandey, The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi, u V. Faraco (ur.), *Lignocellulose Conversion*, Springer, Berlin, 2013, str. 131–149.
- [6] J. Zheng, A. Negi, C. Khomlaem, B. S. Kim, Comparison of Bioethanol Production by *Candida molischiana* and *Saccharomyces cerevisiae* from Glucose, Cellobiose, and Cellulose, *J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2019) 905–912.
- [7] URL: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production> (pristup 8.4.2022.)
- [8] S. Krishnan, M. F. Ahmad, N. A. Zainuddin, M. F. Din, S. Rezania, S. Chelliapan, S. M. Taib, M. Nasrullah, Z. A. Wahid, Bioethanol production from lignocellulosic biomass (water hyacinth): A biofuel alternative, u L. Singh, A. Yousuf i D. Mahapatra (ur.), *Bioreactors: Sustainable Design and Industrial Applications in Mitigation of GHG Emissions*, Elsevier, Amsterdam, 2020, 123–143.
- [9] M. Pavlečić, V. Lulić, S. Gašpari, M. I. Šantek, P. Horvat, B. Šantek, Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe, *Hrvat. časopis za prehrambenu Tehnol. Biotehnol. i Nutr.* 7 (2012) 112–117.
- [10] P. S. Nigam, A. Singh, Production of liquid biofuels from renewable resources, *Prog. Energy Combust. Sci.* 37 (2011) 52–68.
- [11] P. Halder, K. Azad, S. Shah, E. Sarker, Prospects and technological advancement of cellulosic bioethanol ecofuel production, u K. Azad (ur.), *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment*, Woodhead Publishing, Sawston, 2019, str. 211–236.
- [12] C. Wyman, *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, CRC Press, Boca Raton, 1996, str. 37-58.

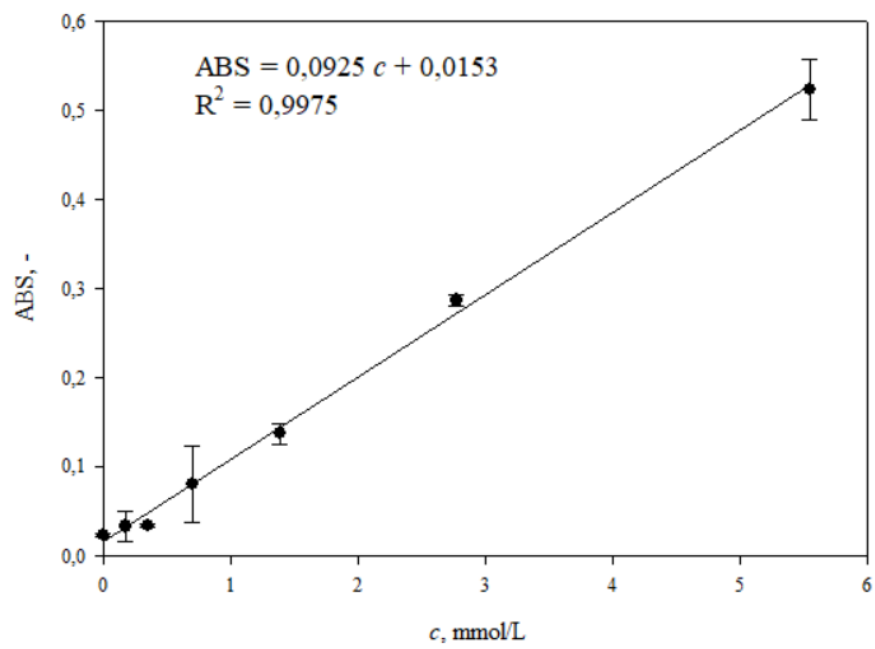
- [13] M. Galbe, O. Wallberg, G. Zacchi, *Techno-Economic Aspects of Ethanol Production from Lignocellulosic Agricultural Crops and Residues*, u M. Moo-Young (ur.), *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, 2011, str. 615–628.
- [14] Y. Dahman, K. Syed, S. Begum, P. Roy, B. Mohtasebi, *Biofuels: Their characteristics and analysis*, u D. Verma, E. Fortunati, S. Jain i X. Zhang (ur.), *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications*, Elsevier, Amsterdam, 2019, str. 277–325.
- [15] J. Rass-Hansen, H. Falsig, B. Jørgensen, C. H. Christensen, *Bioethanol: Fuel or feedstock?*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 329–333.
- [16] R. P. Babu, K. O'Connor, R. Seeram, *Current progress on bio-based polymers and their future trends*, *Prog. Biomater* 2 (2013) 8.
- [17] J. Hill, E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky, D. Tiffany, *Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 11206–11210.
- [18] L. Bhatia, S. Johri, R. Ahmad, *An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review*, *AMB Express* 2 (2012) 65.
- [19] H. K. Jeswani, A. Chilvers, A. Azapagic, *Environmental sustainability of biofuels: A review: Environmental sustainability of biofuels*, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 476 (2020) 20200351.
- [20] T. Rezić, M. Andlar, M. Pavlečić, B. Šantek, M. Ivančić Šantek, *Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina*, *Hrvat. časopis za prehrambenu Tehnol. Biotehnol. i Nutr.* 11 (2016) 6–17.
- [21] M. Ivančić Šantek, I. Zvonar, S. Beluhan, B. Šantek, *Proizvodnja bioetanola iz kukuruznih oklasaka*, *Kem. u Ind.* 67 (2018) 297–308.
- [22] S. I. Mussatto, G. Dragone, I. C. Roberto, *Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications*, *J. Cereal Sci.* 43 (2006) 1–14.
- [23] A. Karlović, A. Jurić, N. Ćorić, K. Habschied, V. Krstanović, K. Mastanjević, *By-Products in the Malting and Brewing Industries—Re-Usage Possibilities*, *Fermentation* 6 (2020) 82.
- [24] Z. Predojevic, *Pretreatments of lignocellulosic feedstock for bioethanol production*, *Hem. Ind.* 64 (2010) 283–293.
- [25] C. Häggström, U. Rova, T. Brandberg, D. B. Hodge, *Integration of Ethanol Fermentation with Second Generation Biofuels Technologies*, u N. Qureshi, D. B. Hodge i A. A. Vertès (ur.), *Biorefineries*, Elsevier, Amsterdam, 2014, str. 161-187.

- [26] M. I. Šantek, E. Miškulin, S. Beluhan, B. Šantek, Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva, *Kem. u Ind.* 65 (2016) 25–38.
- [27] G. M. Walker, *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*, BookBoon, London, 2012, str. 64-66.
- [28] V. Petravić Tominac, M. Tolvajčić, D. Stanzer, J. Mrvčić, B. Šantek, Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina, *Glas. zašt. bilja.* 40 (2017) 24–33.
- [29] R. Joseph i A. K. Bachhawat, *Yeasts: Production and Commercial Uses*, u C. A. Batt i M. L. Tortorello (ur.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, Cambridge, 2014, str. 823-830.
- [30] D. Radecka, V. Mukherjee, R. Q. Mateo, M. Stojiljkovic, M. R. Foulquié-Moreno, J. M. Thevelein, Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation, *FEMS Yeast Res.* 15 (2015) fov053.
- [31] K. Robak, M. Balcerek, Review of second generation bioethanol production from residual biomass, *Food Technol. Biotechnol.* 56 (2018) 174–187.
- [32] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition, Garland Science, New York, 2007, str. 34.
- [33] N. Dufour, J. Swana, R. P. Rao, *Plant Biomass Conversion. Vol. 1*, John Wiley & Sons Inc., Chichester, 2011 str. 157–197.
- [34] A. V. Gusakov, E. G. Kondratyeva, A. P. Sinitsyn, Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities, *Int. J. Anal. Chem.* 2011 (2011) 1–4.
- [35] W. Marsden, P. P. Gray, G. J. Nippard, M. R. Quinlan, Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32 (1982) 1016–1022.
- [36] A. Rascón-Careaga i ostali, Validation and Estimation of Uncertainty for a Glucose Determination Method GOD-PAP Using a Multi-calibrator as Reference, *Mapan - J. Metrol. Soc. India* 36 (2021) 269–278.
- [37] M. Tišma, A. Jurić, A. Bucić-Kojić, M. Panjičko, M. Planinić, Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols, *J. Inst. Brew.* 124 (2018) 182–186.
- [38] S. Liu, *Bioprocess Engineering. Vol. 2*, Elsevier, New York, 2017, str. 109–140.
- [39] Z. Findrik, *Studij reakcija kataliziranih oksidazama aminokiselina*, Doktorska disertacija, Zagreb, 2006, str. 33–36.

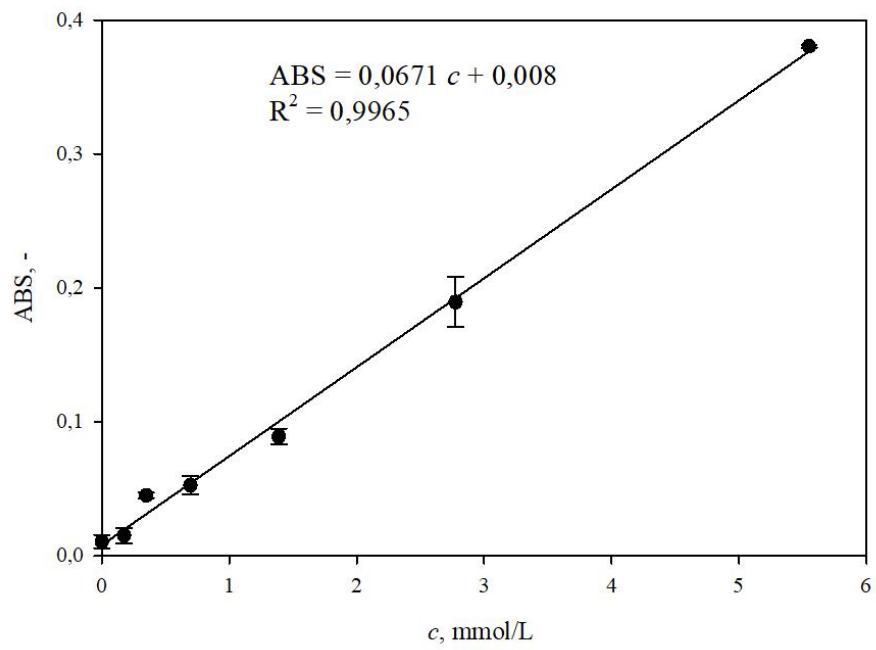
- [40] T. K. Ghose, R. D. Tyagi, Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 1401–1420.
- [41] A. K. Sulieman, M. D. Putra, A. E. Abasaeed, M. H. Gaily, S. M. Al-Zahrani, M. A. Zeinelabdeen, Kinetic modeling of the simultaneous production of ethanol and fructose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Electron. J. Biotechnol.* 34 (2018) 1–8.
- [42] M. Pavlečić i ostali, Mathematical Modelling of Bioethanol Production from Raw Sugar Beet Cossettes in a Horizontal Rotating Tubular Bioreactor, *Fermentation*, 8 (2021) 13.
- [43] G. M. Walker, *Yeast Physiology and Biotechnology*. Vol. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1998, str. 56.
- [44] A. Tesfaw, F. Assefa, Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization, *Int. Sch. Res. Not.* 2014 (2014), 1–11.
- [45] Y. Ni, R. R. Chen, Accelerating whole-cell biocatalysis by reducing outer membrane permeability barrier, *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 804–811.
- [46] J. Britton, S. Majumdar, G. A. Weiss, Continuous flow biocatalysis, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 5891–5918.
- [47] K. Takeshige, K. Ouchi, Reconstruction of ethanol fermentation in permeabilized cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Bioeng.* 79 (1995) 11–16.
- [48] K. Kucharska, P. Rybarczyk, I. Hołowacz, R. Łukajtis, M. Glinka, M. Kamiński, Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes, *Molecules* 23 (2018) 2937.
- [49] L. J. Jönsson, B. Alriksson, N.-O. Nilvebrant, Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013) 1-16.

8. Prilozi

Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih šećera



Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze



Prilog 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije tvari u prisutnih lignoceluloznoj sirovini

- glukoza:

$$\text{Površina pika} = 135278\gamma_{\text{glukoza}} - 3377$$

$$R^2 = 0,9997$$

- ksiloza:

$$\text{Površina pika} = 129878\gamma_{\text{ksiloza}} - 627,53$$

$$R^2 = 0,9998$$

- arabinoza:

$$\text{Površina pika} = 61091\gamma_{\text{arabinoza}} + 8832,5$$

$$R^2 = 0,9934$$

- mravlja kiselina:

$$\text{Površina pika} = 47328\gamma_{\text{mravlja kiselina}} + 53,595$$

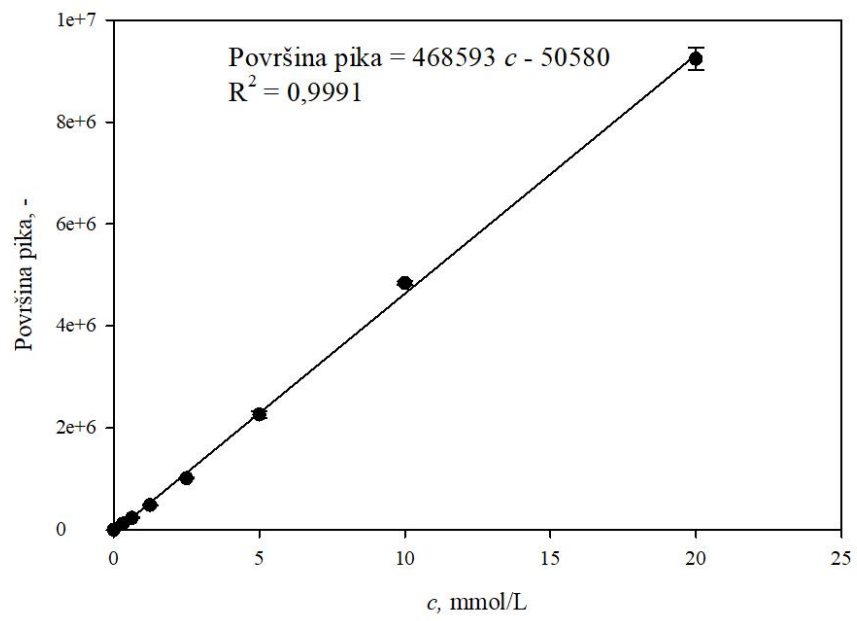
$$R^2 = 1,0000$$

- octena kiselina:

$$\text{Površina pika} = 57358\gamma_{\text{octena kiselina}} + 697,25$$

$$R^2 = 1,0000$$

Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola



Prilog 5. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje brzine kemijske reakcije (k)

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: S, E
```

```
Params: k, Y
```

```
S'=-k*S
```

```
E'=k*S/Y
```

```
t=0
```

```
S=1
```

```
E=0
```

```
k=0.001
```

```
Y= 0.0728
```

```
***
```

Prilog 6. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje parametara Ghose-Tyagi-ova modifikacije Monodove kinetike

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: X, S, E

Params: Ks, mimax

$mi = mimax * S / (Ks + S) * (1 - E/E1)$

$X' = mi * X$

$S' = -mi * X / yxs$

$E' = mi * X / yxe$

t=0

x=1

S= raspon vrijednosti: 5 – 50

E=0

mimax=0.001

Ks= vrijednosti: 12.602 ili 21.616

yx= raspon vrijednosti: 0 - 1

yxe= raspon vrijednosti: 0 - 1

E1=18.002

Prilog 7. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST matematičkog modela procesa provedenog u reaktoru s dotokom

– Šaržni proces

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: X, S, E

Params: mimax

$mi = mimax * S / (Ks + S) * (1 - E / E1)$

$X' = mi * X$

$S' = -mi * X / yxs$

$E' = mi * X / yxe$

t=0

X=1

S=5

E=0

mimax=0.01

Ks= 12.602

yx= raspon vrijednosti: 0 – 1

yxe= raspon vrijednosti: 0 – 1

E1=18.002

– Šaržni proces s dotokom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: mX, mS, mE, E, S, X

Params: Ks, mimax

$mi = mimax * ms / (Ks + ms) * (1 - me / me1)$

$E = me / V$

$$S = m_s / V$$

$$X = m_x / V$$

$$v' = -qv$$

$$mX' = m_i * mX$$

$$mS' = qv * S_0 / V - m_i * mX / y_{xs}$$

$$mE' = m_i * mX / y_{xe}$$

$$t = 0$$

$$X = \text{raspon vrijednosti: } 1 - 2$$

$$S = \text{raspon vrijednosti: } 0.5 - 3$$

$$S_0 = 200$$

$$E = 0$$

$$m_x = \text{raspon vrijednosti: } 0.5 - 5$$

$$mS = \text{raspon vrijednosti: } 0 - 2.5$$

$$mE = 0$$

$$m_{i\max} = 0.01$$

$$K_s = 12.602$$

$$y_{xs} = \text{raspon vrijednosti: } 0 - 1$$

$$y_{xe} = \text{raspon vrijednosti: } 0 - 1$$

$$mE_1 = 9.001$$

$$V = 0.5$$

$$qv = \text{vrijednosti: } 0.00126 \text{ ili } 0.00252$$

Prilog 8. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST matematičkog modela procesa provedenog s hidrolizatom pivskog tropa

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: X, S, E, U
```

```
Params: mimax
```

```
mi=mimax*S/(Ks+S)*(1-E/E1)
```

```
X'=mi*X
```

```
S'=-mi*X/yxs
```

```
E'=mi*X/yxe
```

```
U'=-mi*X/yxs
```

```
t=0
```

```
X=3.60
```

```
S=18.30
```

```
E=0
```

```
U=40.00
```

```
mimax=0.001
```

```
Ks=12.602
```

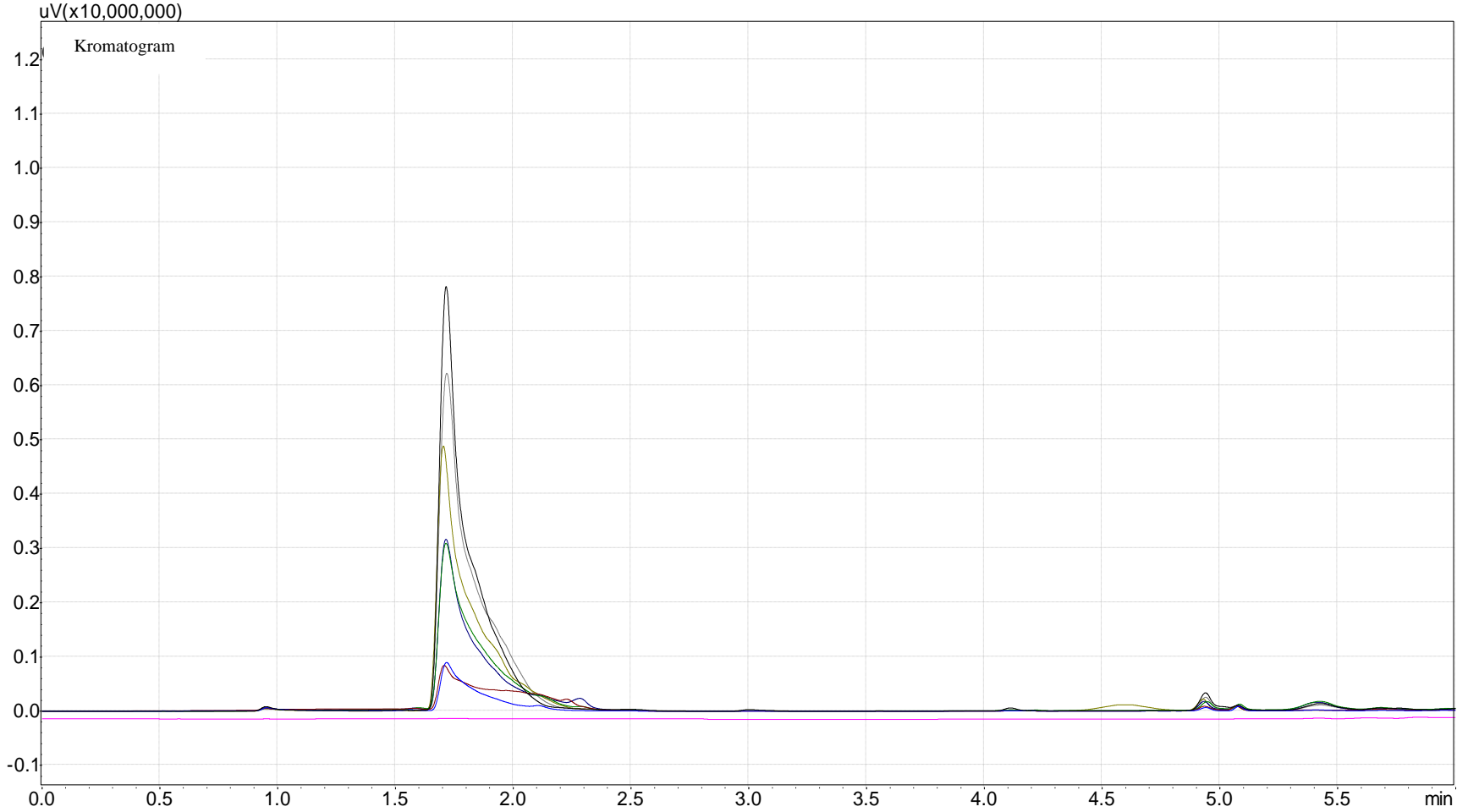
```
yxs= raspon vrijednosti: 0 – 1
```

```
yxe= raspon vrijednosti: 0 – 1
```

```
E1=18.002
```

```
***
```

Prilog 9. Kromatogrami GC analize uzoraka prikupljenih u različitim vremenima fermentacije provedenom s hidrolizatom pivskog tropa tretiranog s NaOH



Sažetak

Proizvodnja bioetanol iz enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog tropa

Marko Božinović, Renata Vičević, Nikolina Zekić

Bioetanol je alkohol dobiven fermentacijom ugljikohidrata. Danas se bioetanol najviše proizvodi iz sirovina na bazi šećera ili škroba pomoću kvasaca kao što je *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* je najzastupljeniji kvasac u industrijskim procesima. Gotovo cjelokupna svjetska proizvodnja bioetanol se provodi pomoću *S. cerevisiae* zbog visokog prinosa koji iznosi 0,45-0,50 grama etanola po gramu glukoze, visoke produktivnosti od 2-5 g/(L·h) te mogućnosti rasta pri visokim koncentracijama šećera i bioetanol.

U ovom radu provedena je fermentacija glukoze primjenom 7 komercijalno dostupnih kvasaca roda *Saccharomyces*. Preliminarna istraživanja pokazala su da su kvasci *S. cerevisiae* – suhi kvasac i *S. cerevisiae* var. *bayanus* – vinski kvasac najpogodniji za proizvodnju bioetanol. Suhi kvasac izabran je za provedbu daljnjih istraživanja zbog najveće prosječne brzine potrošnje glukoze ($k = 0,516 \pm 0,030$ g/(L·h)) za potpunu potrošnju) pritom dajući, s obzirom na početnu koncentraciju glukoze, relativno veliku koncentraciju bioetanol ($\gamma_E = 0,059 \pm 0,001$ g/L). Drugi kvasac odabran za daljnja istraživanja bio je vinski kvasac koji je najsporije trošio glukozu ($k = 0,086 \pm 0,008$ g/(L·h)), ali je provedbom fermentacije s ovim kvascem postignuta najveća koncentracija bioetanol ($\gamma_E = 0,060 \pm 0,007$ g/L). Kako bi se ispitaio utjecaj koncentracije glukoze na učinkovitost i produktivnost procesa provedena je fermentacija hranjivih podloga u kojima je početna koncentracija glukoze bila 5, 10 i 50 g/L. Najveća produktivnost i učinkovitost bioprocasa ($Pr = 0,085 \pm 0,001$ g/(L·h) i $E = 80,668 \pm 0,561$ %) je postignuta u procesu provedenim sa suhim kvascem u kojemu je početna koncentracija glukoze bila 5 g/L te su ta koncentracija glukoze i kvasac odabrani za daljnju provedbu procesa. S ciljem intenzifikacije procesa provedena je fermentacija u šaržnom reaktoru s dotokom supstrata što nije rezultiralo povećanjem učinkovitosti i produktivnosti. Iz tog razloga, kao i zbog jednostavnosti i ekonomske opravdanosti procesa, provedena je fermentacija hidrolizata pivskog tropa u šaržnom reaktoru. Fermentacija je provedena s četiri različita kiselinska hidrolizata pivskog tropa kojemu je podešavanje pH provedeno s NaOH ili Ca(OH)₂ te s dodatkom ili bez aktivnog ugljena). Najučinkovitijim hidrolizatom pokazao se onaj tretiran s aktivnim ugljenom i Ca(OH)₂ fermentacijom kojeg su postignuti sljedeći pokazatelji uspješnosti procesa: $Y_P = 8,576 \pm 0,247$ g/L, $Y_{P/S} = 0,502 \pm 0,014$ g/g, $E = 98,148 \pm 2,829$ % i $Pr = 0,332 \pm 0,010$ g/(L·h).

Ključne riječi: bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentacija, pivski trop

Summary

Production of bioethanol from enzymatic and acid hydrolyzate of brewer's spent grain

Marko Božinović, Renata Vičević, Nikolina Zekić

Bioethanol is an alcohol produced by fermentation from carbohydrates. Today, it is usually produced from raw materials based on sugar or starch using yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* is the most commonly used yeast in modern industrial processes. Almost all global production of bioethanol is done with this yeast because of its high yield of 0.45-0.50 grams of ethanol per gram of glucose, high productivity of 2-5 g/(L·h) and ability to grow at high concentrations of sugars and bioethanol.

In this work, glucose fermentation was carried out using 7 commercially available yeasts of the genus *Saccharomyces*. Preliminary research has shown that the yeasts *S. cerevisiae* - dry yeast and *S. cerevisiae* var. *bayanus* - wine yeast is the most suitable for bioethanol production. The dry yeast was selected for further studies because it has the highest average glucose consumption rate ($k = 0.516 \pm 0.030$ g/(L·h)) and gives a relatively high bioethanol concentration ($\gamma_E = 0.059 \pm 0.001$ g/L). The second yeast selected for further research was wine yeast, although it had the lowest average glucose consumption rate ($k = 0.086 \pm 0.008$ g/(L·h)), but yielded the highest bioethanol concentration of all yeasts ($\gamma_E = 0.060 \pm 0.007$ g/L). To investigate the effect of glucose concentration on the efficiency and productivity of the process, fermentation of culture medium containing 5, 10, and 50 g/L glucose was performed. The highest productivity and efficiency of the bioprocess was obtained by fermentation of medium containing 5 g/L glucose with dry yeast ($Pr = 0.085 \pm 0.001$ g/(L·h) and $E = 80.668 \pm 0.561\%$), and further research was conducted with this system. In order to intensify the bioprocess, the fermentation was carried out in a batch reactor with continuous substrate feed, but this did not lead to increased efficiency and productivity. For this reason, and because of the simplicity of the process, the fermentation reaction of the hydrolysates of brewer's spent grain was carried out in a batch reactor. The fermentation was carried out with four different acid hydrolysates of brewer's spent grain with or without the addition of activated carbon and by adjusting the pH value with NaOH or Ca(OH)₂. The most efficient hydrolysate was the one treated with activated carbon and Ca(OH)₂, with the following bioprocess efficiency parameters: $Y_P = 8.576 \pm 0.247$ g/L, $Y_{P/S} = 0.502 \pm 0.014$ g/g, $E = 98.148 \pm 2.829\%$ and $Pr = 0.332 \pm 0.010$ g/(L·h).

Keyword: bioethanol, Saccharomyces cerevisiae, fermentation, brewer's spent grain

Životopisi

Marko Božinović rođen je 1998. u Zagrebu. U prvom razredu srednje škole osvojio je 3. mjesto na državnom natjecanju iz biologije u istraživačkim radovima s temom rada Biomars. Godine 2017. upisuje preddiplomski studij kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a 2021. godine završava ga i stječe titulu *univ. bacc. ing. cheming*. Nakon završetka preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij na istom Fakultetu. Sudjelovao je na međunarodnim i nacionalnim konferencijama gdje je prezentirao svoje radove putem posterskih priopćenja: 1st International Conference on Micromachines and Applications (ICMA2021) („Purification of biodiesel produced by lipase catalysed transesterification by two-phase systems based on deep eutectic solvents in a microextractor: Selection of solvents and process optimization“, doi:10.3390/Micromachines2021-09592), XIV. susret mladih kemijskih inženjera („Ekstrakcija enzima *endo*-1,4-ksilanaza“) i 2. međunarodna studentska GREEN konferencija („Liquid-liquid extraction of *endo*-1,4-xylanase in a microextractor“). Marko Božinović radio je kao stručni suradnik u rješavanju problemskih zadataka za tvrtku Quizlet na područjima opće kemije, fizikalne kemije, analitičke kemije i organske kemije u razdoblju od veljače 2021. do veljače 2022. Za vrijeme rada, nagrađen je je kao najbolji stručni suradnik u području kemije za godinu 2021. Stručnu praksu odradio je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ u Zagrebu.

Renata Vičević rođena je 16. svibnja 1998. godine u Rijeci. Preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisala je 2017. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a završava ga 2021. godine. Iste godine upisuje diplomski studij Kemijskog inženjerstva na istom Fakultetu, modul Kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša. Stručnu praksu odradila je na NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“, a od 2020. godine aktivna je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera. U protekle dvije akademske godine obavlja ulogu demonstratora na kolegiju Stručna praksa. S posterskim priopćenjima „Dinamičko raspršenje svjetlosti: raspodjela veličine i zeta potencijal nanočestica TiO₂ u različitim matricama“ i „Ekstrakcija enzima *endo*-1,4-ksilanaza“ sudjelovala je na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera te s posterskim priopćenjem Liquid-liquid extraction of *endo*-1,4-xylanase in a microextractor na 2. međunarodnoj studentskoj GREEN konferenciji. Tijekom studija položila je C1.1 certifikat iz engleskog jezika, B2 iz talijanskog jezika te A2 iz španjolskog jezika.

Nikolina Zekić rođena je 16. svibnja 1998. godine u Zagrebu. Nakon završene opće gimnazije u „Srednjoj školi Dugo Selo“, 2017. godine upisuje preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Preddiplomski studij završava 2021. godine pod vodstvom prof. dr. sc. Elvire Vidović s temom „Priprava i karakterizacija željezovih nanočestica“. Nakon završenog preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij Kemijsko inženjerstvo na istoimenom Fakultetu. Stručnu praksu odrađuje 2019. godine na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“. Od 2020. godine je aktivan član Studentske sekcije HDKI te je dobitnica Rektorove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici u akademskoj godini 2020./2021. za organizaciju projekta „*First Conference of European Clean Energy Transition*“. 2022. godine sudjelovala je na međunarodnim i nacionalnim konferencijama: XIV. susret mladih kemijskih inženjera (posterska priopćenja: „Ekstrakcija enzima *endo-1,4*-ksilanaza vodenim dvofaznim sustavima“ i „Sinteza i karakterizacija neutralnih željezovih nanočestica“) i 2. međunarodnoj studentskoj GREEN konferenciji (postersko priopćenje: „*Liquid-liquid extraction of endo-1,4-xylanase in a microextractor*“).