



ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD/ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanol na svježem soku šećerne repe

Comparison Between Different Cultivation Techniques for Bioethanol Production from Raw Sugar Beet Juice

Mladen Pavlečić, Vedran Lulić, Slavica Gašpari, Mirela Ivančić Šantek, Predrag Horvat, Božidar Šantek*

Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, Zagreb

Sažetak

U ovom istraživanju proučavana je proizvodnja bioetanol na svježem soku šećerne repe s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Za vođenje procesa proizvodnje bioetanol primjenjene su ove tehnike: šaržni proces, šaržni proces s pritokom supstrata i polukontinuirani proces. Tijekom šaržnog procesa proizvodnje bioetanol stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{p/S}$) je iznosio 0,375 g/g, učinkovitost bioprocasa (E) 69,70 %, te produktivnost (Pr) procesa 0,53 g/Lh. U šaržnom procesu s pritokom supstrata dobivene su ove vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa: $Y_{p/S} = 0,502$ g/g, $E = 93,40$ % i $Pr = 0,50$ g/Lh. Nadalje, tijekom polukontinuirane proizvodnje bioetanol pokazatelji uspješnosti bioprocasa su imali ove vrijednosti: $Y_{p/S} = 0,360$ g/g, $E = 66,91$ % i $Pr = 0,66$ g/Lh. Na osnovi prethodno prikazanih rezultata jasno je da šaržni proces s pritokom supstrata i polukontinuirani proces imaju značajno veći potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji bioetanol iako je potrebna daljnja optimizacija polukontinuirane tehnike vođenja bioprocasa.

Ključne riječi: bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*, svježi sok šećerne repe, različite tehnike vođenja bioprocasa

Summary

In this investigation, the production of bioethanol on the raw sugar beet juice by *Saccharomyces cerevisiae* was studied. Following cultivation techniques for bioethanol productions were used: batch, fed batch and repeated batch. In batch process substrate conversion coefficient ($Y_{p/S}$) was 0,375 g/g, bioprocess efficiency (E) 69,70 % and productivity (Pr) 0,53 g/Lh, respectively. During fed batch process bioprocess efficiency parameters have following values: $Y_{p/S} = 0,502$ g/g, $E = 93,4$ % and $Pr = 0,50$ g/Lh. Furthermore, in repeated batch process bioprocess efficiency parameters have following values: $Y_{p/S} = 0,360$ g/g, $E = 66,91$ % and $Pr = 0,66$ g/Lh. On the basis of previously presented results it is clear that fed batch and repeated batch processes have considerably higher potential for use in the industrial bioethanol production although further optimization of repeated batch cultivation techniques has to be performed.

Keywords: bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, raw sugar beet juice, different cultivation techniques

1. Uvod

Nestašica fosilnih goriva, njihov negativan utjecaj na okoliš te visoka i nestabilna cijena, kao i sve veća potreba za energijom, rezultirala je traženjem alternativnih, obnovljivih izvora energije. Biogoriva su ekološki prihvatljivija od fosilnih, ali im je proizvodnja još uvijek skuplja. Europska komisija usvojila je Strategiju za biogoriva, koja nizom tržišnih, zakonodavnih i istraživačkih mjera potiče proizvodnju biogoriva (Dias i sur. 2009).

Uz biodizel, bioetanol je jedan od najznačajnijih biogoriva današnjice. Bioetanol se primjenjuje kao pogonsko gorivo u smjesi s benzinom koja se naziva gasohol (E-5, E-10, E-15, E-85) ili kao E-100 (bezvodni etanol) što iziskuje primjenu specifičnih motora. Osim kao gorivo bioetanol se koristi i za proizvodnju ETBE (etil-tetrabutil-etera) (Hinkova i Bubnik, 2001). Pozitivna svojstva bioetanol kao goriva su veći oktanski broj, niska toksičnost i viša temperatura isparavanja od benzina što omogućava veću kompresiju i kraće vrijeme izgaranja. Nedostaci bioetanol kao goriva su korozivno djelovanje na motor i spremnik za gorivo, manji tlak para, te higroskopnost (Madson i Monceaux, 2003). Energetska vrijednost bioetanol manja je u odnosu na benzin (1 L benzina ekvivalentna je 1,2-1,5 L bioetanol). Kao nedostatak bioetanol navodi se i primjena izvora hrane kao osnovnih sirovina za njegovu proizvodnju što može uzrokovati povećanje cijene hrane (Hinkova i Bubnik, 2001).

Etanol se može proizvesti petrokemijskim i fermentacijskim postupkom. Petrokemijski ili sintetski etanol je etanol sintetiziran iz etilenskih sirovina. Najčešće se primjenjuje u industrijske svrhe za sintezu drugih spojeva kao što su octena kiselina, butadien, etilni klorid (Mills i Ecklund, 2007). Drugi način dobivanja etanol je mikrobna fermentacija šećera iz obnovljivih sirovina uglavnom pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Prema sastavu, obnovljive sirovine za proizvodnju bioetanol možemo podijeliti na: šećerne, škrobne i lignocelulozne sirovine. Najznačajnije šećerne sirovine za proizvodnju bioetanol su šećerna trska i šećerna repa. Obje sirovine se mogu izravno primijeniti za proizvodnju bioetanol. Šećerna repa je dvogodišnja biljka, a industrijski najvažniji dio šećerne repe je korijen koji sadrži najviše sahara. Šećerne repa se uzgaja za proizvodnju šećera, a u novije vrijeme sve više i za proizvodnju bioetanol. Mnoge šećerane uz postrojenje za proizvodnju šećera imaju i postrojenje za proizvodnju bioetanol. Nusproizvodi proizvodnje šećera iz šećerne repe (melasa i repini rezanci), kao i međuprodukti proizvodnje šećera (rijetki i gusti sok) mogu se također primijeniti za proizvodnju bioetanol. Rijetki sok šećerne repe (14 - 18 % šećera) se dobiva procesom vodene ekstrakcije svježih rezanaca šećerne repe, a gusti sok (60 - 80 % šećera) procesom ugušćivanja rijetkog soka šećerne repe (Draycott, 2006; Henke i sur. 2005; Madson i Monceaux, 2003; Wenner, 2003).

Corresponding author: bsantek@pbf.hr



Šećerna trska se uglavnom koristiti u obliku rijetkog ili gustog soka, a njezina melasa se također može primjeniti za proizvodnju bioetanola (Glyn, 2004).

Najzastupljenija škrobna sirovina u SAD-u je kukuruz, a u Europi su to pšenica, raž, ječam i krumpir. Zrno pšenice, raži i ječma prosječno sadrži 60-70 % škroba, 15 % vode, a ostatak čine proteini, masti, celuloza i minerali. Svježi krumpir sadrži 75 % vode, 17 % škroba, a ostatak čine proteini i šećeri. Primjena škrobnih u odnosu na šećerne sirovine je nešto kompliciranija jer zahtjeva prethodnu obradu, odnosno enzimsku hidrolizu škroba do jednostavnih šećera. Enzimska hidroliza podrazumijeva klajsterizaciju, likvefakciju i ošećerenje na određenim temperaturama uz primjenu enzima (Cárdena i Sanchez, 2007).

Lignocelulozne sirovine kao trava, slama i drvo su jeftine sirovine jer su otpaci poljoprivredne proizvodnje i drvne industrije, te su dostupne u relativno velikim količinama. Lignocelulozne sirovine prije fermentacije zahtijevaju fizikalno-kemijski predtretman nakon čega slijedi enzimska hidroliza. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina nije komercijalizirana, ali postoji nekoliko pilot postrojenja (Thomsen i sur. 2008; Cárdena i Sanchez, 2007).

Industrijska proizvodnja bioetanola najčešće se provodi pri 28-35 °C pomoću kvasca *S. cerevisiae*. Etanol ima inhibitorno djelovanje na odvijanje alkoholnog vrenja, a njegova koncentracija veća od 10 % (vol/vol) može u potpunosti inhibirati rast kvasca u šaržnom procesu (Ricci i sur. 2004). Kao nusprodukt alkoholnog vrenja nastaje ugljikov dioksid. Izlazni plinovi sadrže više od 90 % (vol/vol) ugljikova dioksida, ali i ispareni etanol kojeg je potrebno rekuiperirati. Prije ispuštanja izlaznih plinova u atmosferu potrebno je ukloniti komponente neugodna mirisa. Nastali ugljikov dioksid može se primijeniti u proizvodnji pića (Grba, 2010; Ricci i sur. 2004).

Proizvodnja bioetanola može se voditi kao šaržni, šaržni s pritokom supstrata, polukontinuirani i kontinuirani proces. Izbor najpogodnijeg načina vođenja procesa ovisi o kinetičkim parametrima mikroorganizma, vrsti supstrata i procesnim parametrima uz pažljivo razmatranje ekonomskog aspekta svakog procesa. U cilju povećanja produktivnosti bioprocasa, sve više se koriste tehnike uzgoja i proizvodnje bioetanola u uvjetima visoke koncentracije supstrata. Bez obzira na prisutnost inhibicije supstratom, prisutnost veće koncentracije šećera rezultira većom proizvodnjom etanola. Nakon fermentacije, komina uglavnom sadrži 12-15 % (vol/vol) etanola koji se izdvaja procesom destilacije, a ako se koristi kao biogorivo potrebno je provesti i proces dehidracije etanola (Grba, 2010; Madson i Monceaux, 2003)

U ovom istraživanju proučavat će se proizvodnja bioetanola pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na svježem (rijetkom) soku šećerne repe koji nastaje kao intermedijer proizvodnje šećera. Za vođenje procesa proizvodnje etanola primijenit će se ove tehnike vođenja bioprocasa: šaržni proces, šaržni proces s pritokom supstrata i polukontinuirani proces. Na kraju istraživanja izvršit će se međusobna usporedba različitih tehnika proizvodnje etanola na osnovi pokazatelja uspješnosti bioprocasa.

2. Materijali i metode

Radni mikroorganizam, hranjiva podloga i priprema inokuluma

Kao radni mikroorganizam korištena je kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* iz Zbirke mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Hranjive podloge korištene u ovom istraživanju su svježi (ri-

jetki) sok (oko 160 - 180 g/L šećera) i ugušćeni sok šećerne repe (oko 800 g/L šećera) koji je korišten samo za proces prihrane tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata. Rijetki sok šećerne repe je kompleksna hranjiva podloga kojoj je dodan izvor dušika i fosfora, tj. anorganska sol $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 g/L). Hranjiva podloga sterilizirana je u bioreaktoru s indirektnom parom na 121 °C kroz 20 minuta. Čista kultura kvasca *S. cerevisiae* nacjepljena je u Erlenmayer tikvice, a potom je proveden uzgoj inokuluma na tresilici (rotacija 150 okr/min) pri 28 °C kroz 72 h. Za nacjepljivanje bioreaktora s 4,5 L podloge korišteno je 0,5 L svježe kulture kvasca (10 % vol/vol inokuluma). Početni volumen inokulirane hranjive podloge u bioreaktoru s mješalom je kod svih tehnika vođenja proizvodnje bioetanola iznosio 5,0 L.

Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe

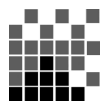
Kod šaržnog procesa bioreaktor je inokuliran s 10 % vol/vol prethodno uzgojene kulture kvasca *S. cerevisiae*, a početna koncentracija šećera iznosila je 161,42 g/L. Šaržni proces proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe proveden je pri temperaturi od 28 °C i rotaciji mješala od 400 min^{-1} , a proces aeracije je trajao prvih 10 h bioprocasa.

Šaržni dio procesa s pritokom supstrata proveden je u istim uvjetima kao što je prethodno navedeno na podlozi s početnom koncentracijom šećera od 75,33 g/L uz 12 h aeracije. Da bi se spriječila početna inhibicija supstratom proizvodnje bioetanola tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata, rijetki sok šećerne repe je razrijeđen s vodovodnom vodom (omjer 1:1). Proces prihrane tijekom ove tehnike vođenja bioprocasa je započeo kada je koncentracija šećera u komini pala ispod 10 g/L. Prihrana je provedena u 5 obroka po 200 mL ugušćenog soka šećerne repe (oko 800 g/L šećera).

Šaržni dio polukontinuiranog procesa proveden je u istim uvjetima kao kod šaržnog procesa. Koncentracija šećera na početku je iznosila 164,93 g/L, a proces je aeriran prvih 10 h. Kada se koncentracija šećera u podlozi smanjila ispod 10 g/L izvršena je izmjena 2,5 L fermentirane podloge s istim volumenom svježe podloge istog sastava kao na početku procesa. Tijekom polukontinuiranog procesa izvršeno je 5 izmjena hranjive podloge. Tijekom ovog istraživanja dinamika proizvodnje bioetanola kod različitih tehnika vođenja bioprocasa praćena je uzimanjem uzoraka ovisno o brzini potrošnje supstrata.

Analitičko praćenje proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe

Tijekom proizvodnje bioetanola praćene su promjene sastojaka hranjive podloge i to: mikrobne biomase (gravimetrijski, broj živih stanica, optička gustoća), supstrata i produkata alkoholnog vrenja, kao i fizikalno-kemijskih parametara bioprocasa (npr. pH i temperatura). Nakon izuzimanja iz bioreaktora 20 mL dobro homogeniziranog uzorka je centrifugirano 15 minuta na 4000 okr/min. Supernatant se nakon odvajanja upotrebljavao za određivanje koncentracije sastojaka hranjive podloge. Kivete s talogom biomase sušene su na 105 °C do konstantne težine. Na prethodno pripremljene sterilne Petrijeve ploče s krutom podlogom za rast kvasca otpipetira se 0,1 mL određenog razrijeđenja uzorka koji se razmaže po ploči Drigalsky štapićem. Ploče su inkubirane na 30 °C kroz 72 sata, a potom se određuje broj izraslih kolonija (CFU). Nadalje, dobro homogeniziranom uzorku određivana je optička gustoća na 600 nm pomoću spektrofotometra (Cary13E, Varian). Za određivanje koncentracije supstrata i produkta alkoholnog vrenja tijekom bioprocasa korištena je visokoučinkovita



tekućinska kromatografija (Shimadzu CLASS-VPLC-10AVP; Japan). Za pripremu svih otopina korištena je demineralizirana voda čija je vodljivost bila manja od 1 μS . Kao pokretna faza korištena je otopina H_3PO_4 (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20 μL svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 30 $^\circ\text{C}$ i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL/min. Svaki uzorak je analiziran tri puta. Nakon kromatografske analize integracija dobivenih rezultata vršila se pomoću računalnog programa CLASS-VP - verzija 6.10.

Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola

Međusobna usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola izvršena je na osnovi pokazatelja uspješnosti bioprocasa kao što su: stupanj konverzije supstrata u produkt, učinkovitost i produktivnost bioprocasa (Marić i Šantek, 2009). Stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) predstavlja masu proizvoda (etanola) po masi supstrata koja se mikrobnom konvertira tijekom bioprocasa. Stupanj konverzije supstrata u etanol ($Y_{P/S}$) može se odrediti pomoću ove ovisnosti:

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{\Delta m_p}{\Delta m_s} \quad [\text{g/g}] \quad (1)$$

gdje je P - koncentracija etanola na kraju bioprocasa, P_0 - koncentracija etanola na početku bioprocasa, S - koncentracija supstrata na kraju bioprocasa, S_0 - koncentracija supstrata na početku bioprocasa, Δm_p - ukupna masa dobivenog produkta u bioreaktoru, Δm_s - ukupna masa utrošenog supstrata u bioreaktoru.

Učinkovitost bioprocasa (E) određivana je prema ovoj ovisnosti:

$$E = \frac{Y_{P/S}}{(Y_{P/S})_t} \times 100 \quad [\%] \quad (2)$$

$(Y_{P/S})_t$ - teorijski stupanj konverzije supstrata u etanol koji za saharozu kao supstrat iznosi 0,538 g/g.

Produktivnost bioprocasa (Pr) se definira kao koncentracija proizvoda (etanola) u jedinici vremena, a računa se prema sljedećoj ovisnosti:

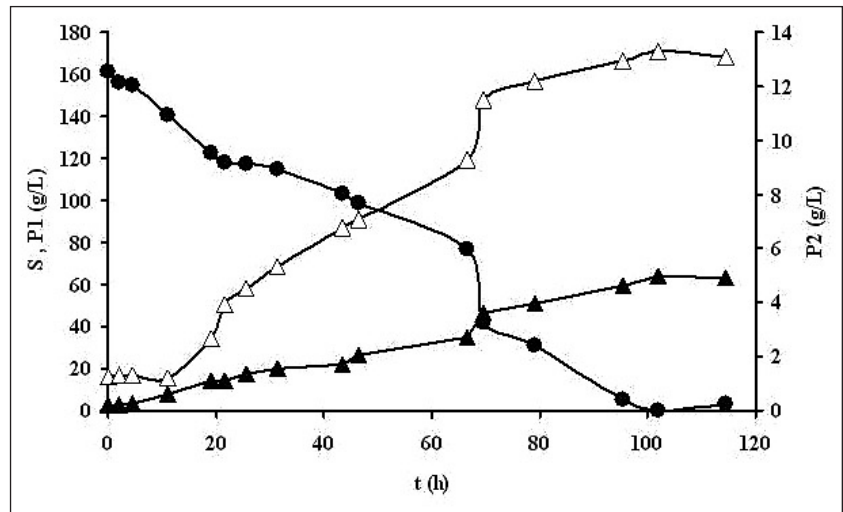
$$Pr = \frac{(P - P_0)}{t} \quad [\text{g/Lh}] \quad (3)$$

gdje je t - vrijeme trajanja bioprocasa [h]

3. Rezultati i rasprava

Šaržni proces proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe

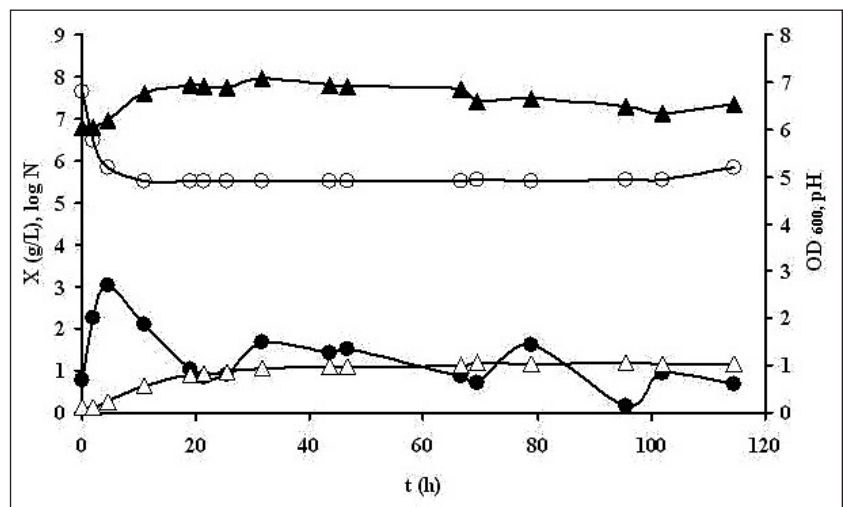
Tijekom preliminarnih istraživanja pogodnosti svježeg (rijetkog) soka šećerne repe kao supstrata za proizvodnju bioetanola (podatci nisu prikazani) utvrđeno je da je nužan dodatak izvora dušika i fosfora u svježem (rijetki) sok šećerne repe da bi se pospješio rast biomase



Slika 1. Promjene koncentracije supstrata (S , ●), etanola ($P1$, ▲) i glicerola ($P2$, Δ) tijekom šaržnog procesa proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe u bioreaktoru s mješalom

Figure 1. Changes of substrate (S , ●), ethanol ($P1$, ▲) and glycerol ($P2$, Δ) concentration during batch fermentation of raw sugar beet juice in stirred tank bioreactor

kvasca, te povećala učinkovitost bioprocasa. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ se pokazao kao najadekvatniji izvor dušika i fosfora za korekciju sastava svježeg soka šećerne repe, stoga je u ovom istraživanju dodano 1 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ u svježi sok šećerne repe. Bioprocasa je vođen u bioreaktoru s mješalom pri temperaturi od 28 $^\circ\text{C}$. Koncentracija šećera u hranjivoj podlozi na početku bioprocasa iznosila je 161,42 g/L, a proces je trajao 114,5 sati (Slika 1.). Relativno dugo vrijeme procesa posljedica je niske početne koncentracije biomase kvasca (0,76 g/L), te je kvascu trebalo više vremena da potroši raspoloživi šećer i proizvede etanol. Na kraju uzgoja detektirana je koncentracija etanola od 63,06 g/L odnosno koncentracija glicerola od 13,07 g/L. Međutim, stvarno dobivena koncentracija etanola je iznosila 60,49 g/L jer je na početku procesa oko 2,57 g/L etanola uneseno s inokulumom. Tijekom ovog procesa zabilježen je rast kvasca samo u početnoj fazi procesa (prvih 20 h) kao posljedica aeracije i dostupnosti izvora dušika i fosfora u hranjivoj podlozi (Slika 2.).



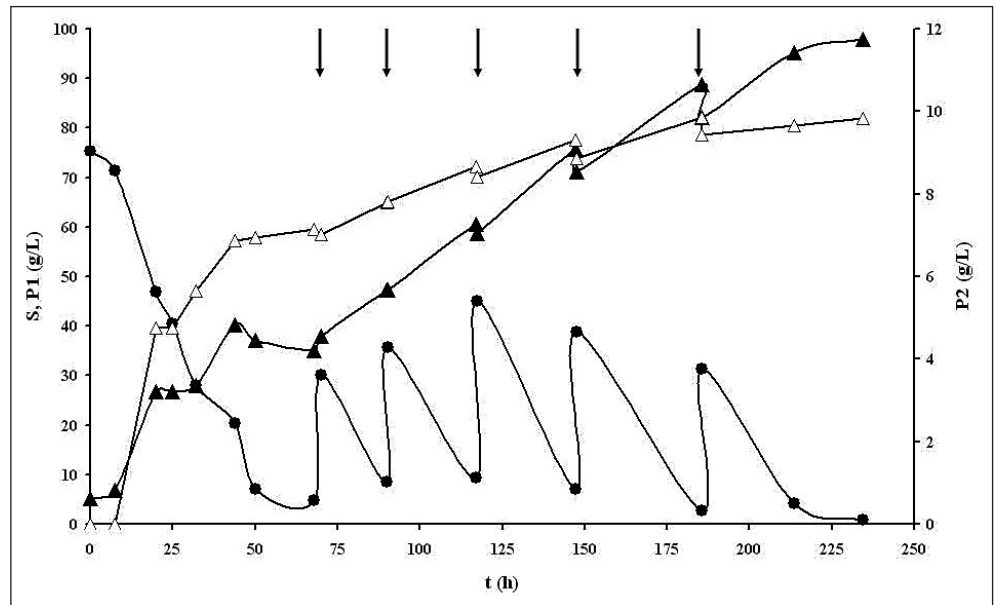
Slika 2. Promjene koncentracije suhe tvari biomase (X , ●), broja živih stanica kvasca ($\log N$, ▲), optičke gustoće medija (OD_{600} , Δ) i pH (○) tijekom šaržnog procesa proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe u bioreaktoru s mješalom

Figure 2. Changes of dry biomass (X , ●), viable cell number ($\log N$, ▲), optical density of broth (OD_{600} , Δ) and pH (○) during batch fermentation of raw sugar beet juice in stirred tank bioreactor

Nakon tog perioda, koncentracija suhe tvari biomase kvasca i broj živih stanica ($\log N$) poprimaju približno konstantne vrijednosti jer kvasac u drugoj fazi ovog bioprocasa započinje intenzivan proces alkoholnog vrenja što se vidi kroz povećanje koncentracije etanola i glicerola (Slika 1.) Tijekom bioprocasa praćena je promjena optičke gustoće hranjive podloge na 600 nm (OD_{600}) kao indirektni pokazatelj rasta biomase kvasca (Slika 2). Promjene optičke gustoće su u skladu s promjenama broja živih stanica kvasca ($\log N$) iako su zabilježena određena odstupanja kao posljedica analitičkih pogriješaka. Prethodno navedeno pokazuje da se optička gustoća može smatrati relativno pouzdanim indikatorom rasta kvasca. Promjene pH vrijednosti hranjive podloge tijekom šaržnog procesa proizvodnje bioetanola također su prikazane na slici 2. Usljed rasta kvasca i potrošnje šećera pH vrijednost hranjive podloge se u početnoj fazi procesa (prvih 20 sati) smanjila na oko 4,9, te je ostala na približno istoj razini do kraja bioprocasa kada je opaženo povećanje najvjerojatnije kao posljedica odumiranja stanica kvasca. Na osnovi prethodno dobivenih rezultata jasno je da hranjiva podloga ima zadovoljavajući puferski kapacitet te da nije nužna regulacija pH vrijednosti tijekom bioprocasa. Nakon 114,5 sati šaržnog procesa proizvodnje bioetanola ukupno je proizvedeno 302,45 g etanola uz produktivnost bioprocasa od 0,53 g /Lh, te efikasnost bioprocasa od 69,70 %. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima (Cárdoma i Sanchez, 2007; Henke i sur. 2005; Ward i Singh 2002).

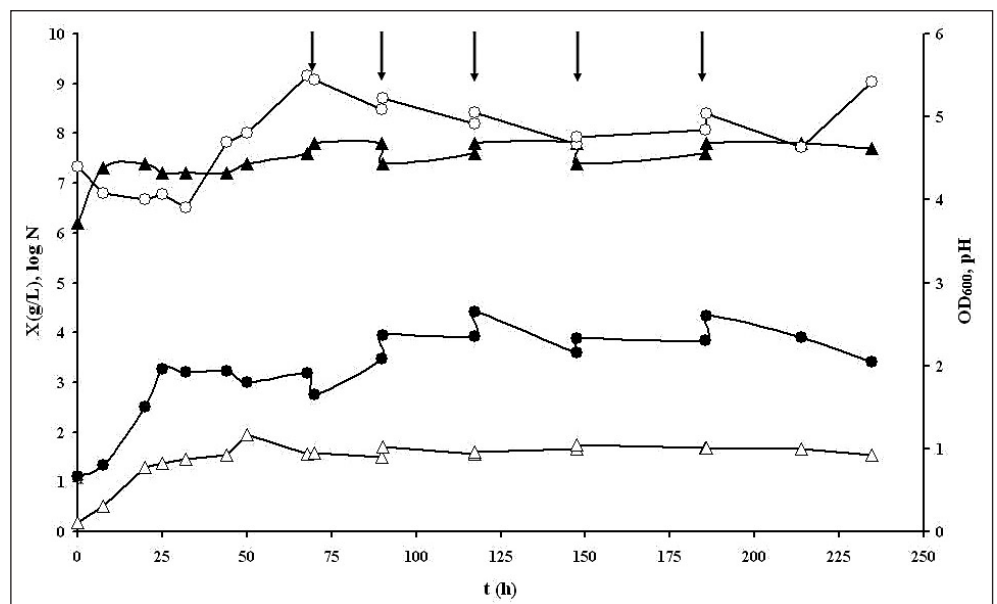
Šaržni proces s pritokom supstrata proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe

Proizvodnja bioetanola šaržnim postupkom s pritokom supstrata provedena je na razrijeđenom svježem soku šećerne repe (omjer svježi sok: vodovodna voda = 1:1) zbog sprječavanja pojave inhibicije supstratom na početku bioprocasa. Početna koncentracija šećera iznosila je 75,33 g/L, a biomase kvasca 1,105 g/L. Tijekom ovog bioprocasa izvršena je prihrana u pet obroka (200 mL ugušćenog soka s oko 800 g/L šećera) kako bi se smanjilo početno inhibicijsko djelovanje



Slika 3. Promjene koncentracije supstrata (S, ●), etanola (P1, ▲) i glicerola (P2, Δ) tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe u bioreaktoru s mješalom. Strjelice označavaju dodatak svježe hranjive podloge.

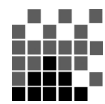
Figure 3. Changes of substrate (S, ●), ethanol (P1, ▲) and glycerol (P2, Δ) concentration during fed batch fermentation of raw sugar beet juice in stirred tank bioreactor. Arrows represent the addition of fresh medium.



Slika 4. Promjene koncentracije suhe tvari biomase (X, ●), broja živih stanica kvasca ($\log N$, ▲), optičke gustoće medija (OD_{600} , Δ) i pH (○) tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe u bioreaktoru s mješalom. Strjelice označavaju dodatak svježe hranjive podloge.

Figure 4. Changes of dry biomass (X, ●), viable cell number ($\log N$, ▲), optical density of broth (OD_{600} , Δ) and pH (○) during fed batch fermentation of raw sugar beet juice in stirred tank bioreactor. Arrows represent the addition of fresh medium.

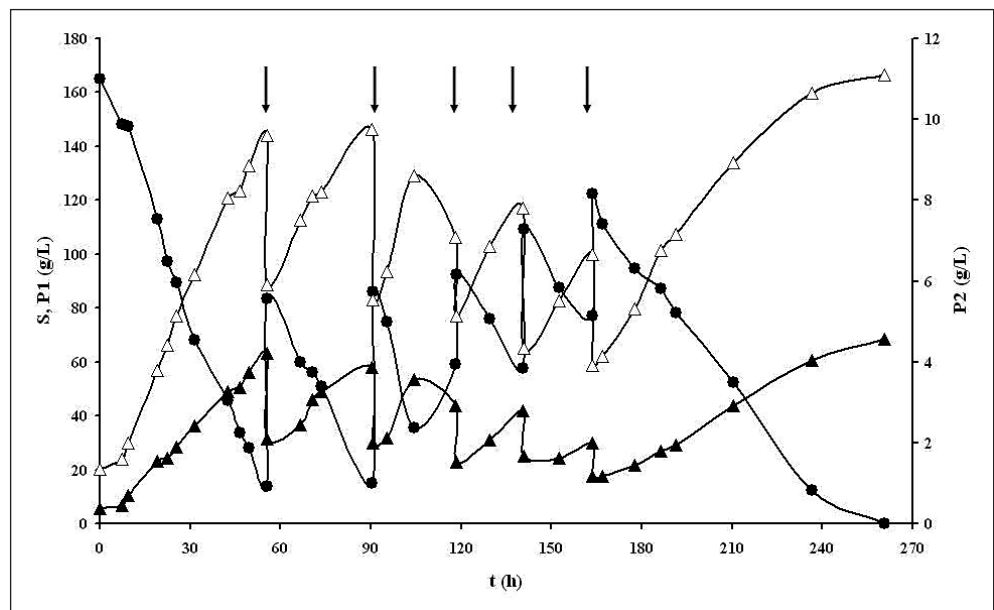
supstrata. Ugušćeni sok šećerne repe dodan je u bioreaktor na kraju šaržnog dijela procesa tj. kada se koncentracija šećera u hranjivoj podlozi smanjila ispod 10 g/L odnosno kada je uočeno da se i koncentracija etanola počela smanjivati (55 - 75 h; Slika 3). Dodatak ugušćenog soka u bioreaktor rezultirao je nastavkom procesa proizvodnje bioetanola, a što se vidi kroz povećanje koncentracije etanola odnosno biomase kvasca (Slike 3 i 4). Kao i u slučaju proizvodnje bioetanola šaržnim postupkom optička gustoća hranjive podloge (OD_{600}) poka-



zala se kao relativno pouzdan indikator rasta biomase kvasca (Slika 4) iako su i u ovom slučaju zabilježena određena odstupanja kao posljedica analitičkih pogriješaka odnosno dodatka ugušćenog soka šećerne repe. pH vrijednost hranjive podloge se smanjuje s potrošnjom šećera, a nakon dodavanja ugušćenog soka u bioreaktor zabilježen je određen porast pH vrijednosti kao posljedica njegove veće pH vrijednosti. Porast pH vrijednosti u zadnjim satima procesa najvjerojatnije je posljedica odumiranja stanica kvasca i njihove autolize (Slika 4). Na kraju šaržnog procesa s pritokom supstrata koncentracija etanola je iznosila 97,99 g/L. Nakon 234,5 sati bioprocesa supstrat je gotovo u potpunosti utrošen pri čemu je ukupno proizvedeno 587,96 g etanola uz produktivnost bioprocesa od 0,50 g/Lh te učinkovitost bioprocesa od 93,4 %. U odnosu na šaržni proces ostvaren je veći prinos etanola uz veću učinkovitost bioprocesa. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima (Grba, 2010; Balat i sur. 2008).

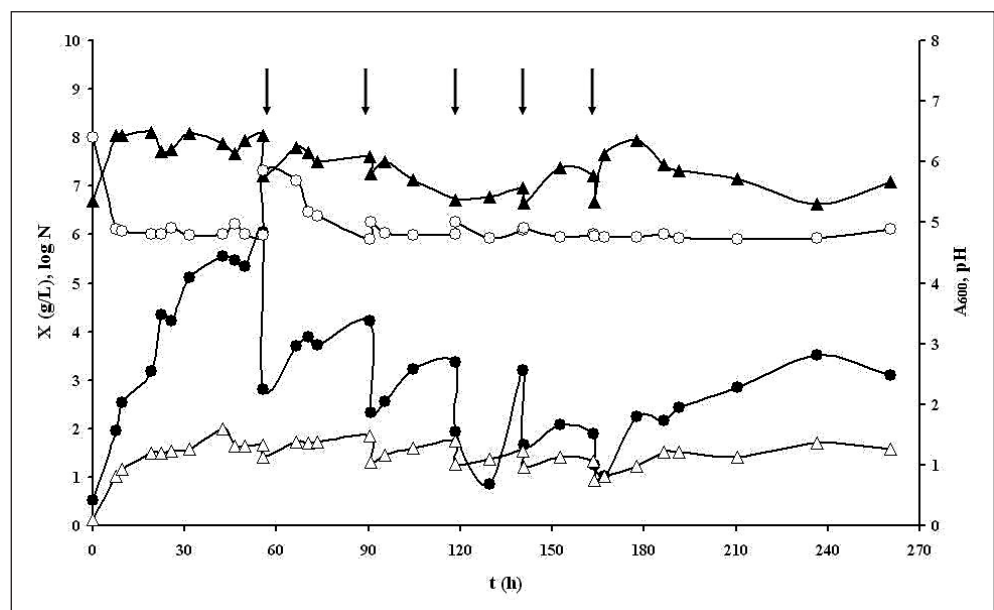
Polukontinuirani proces proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe

U ovom istraživanju proveden je i polukontinuirani način proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe uz dodatak 1 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, a koncentracija šećera u hranjivoj podlozi na početku bioprocesa iznosila je 164,93 g/L. Uzgoj je trajao 260,5 sati tijekom kojeg je izvršeno pet izmjena volumena po 2,5 L podlogom istog sastava kao na početku bioprocesa. Izmjene volumena izvršene su u približno istim vremenskim intervalima kada je koncentracija šećera u hranjivoj podlozi pala ispod 10 g/L. Tijekom zadnje tri izmjene volumena koncentracija šećera u hranjivoj podlozi bila je veća od 10 g/L što se može objasniti kao posljedica nakupljanja štetnih tvari u hranjivoj podlozi koje usporavaju metaboličku aktivnost kvasca, a time i proces proizvodnje bioetanola (Slika 5). Na kraju bioprocesa detektirana je koncentracija etanola od 68,63 g/L. Kod ove tehnike vođenja bioprocesa zabilježene su najveće oscilacije koncentracije suhe tvari biomase kvasca kao posljedica izmjene hranjive podloge, a te promjene se mogu uočiti i kroz promjenu broja živih stanica kvasca (log N) odnosno optičku



Slika 5. Promjene koncentracije supstrata (S, ●), etanola (P1, ▲) i glicerola (P2, Δ) tijekom polukontinuiranog procesa proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe u bioreктору s mješalom. Strjelice označavaju izmjenu hranjive podloge iz bioreaktora.

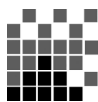
Figure 5. Changes of substrate (S, ●), ethanol (P1, ▲) and glycerol (P2, Δ) concentration during repeated batch fermentation of raw sugar beet juice in stirred tank bioreactor. Arrows represent the medium exchange in bioreactor.



Slika 6. Promjene koncentracije suhe tvari biomase (X, ●), broja živih stanica kvasca (log N, ▲), optičke gustoće medija (OD_{600} , Δ) i pH (○) tijekom polukontinuiranog procesa proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe u bioreктору s mješalom. Strjelice označavaju izmjenu hranjive podloge iz bioreaktora.

Figure 6. Changes of dry biomass (X, ●), viable cell number (log N, ▲), optical density of broth (OD_{600} , Δ) and pH (○) during repeated batch fermentation of raw sugar beet juice in stirred tank bioreactor. Arrows represent the medium exchange in bioreactor.

gustoću hranjive podloge (OD_{600} ; Slika 6). Promjene pH vrijednosti hranjive podloge tijekom polukontinuiranog procesa također su prikazane na slici 6. Kao i kod prethodne dvije tehnike vođenja bioprocesa promjena pH vrijednosti posljedica je potrošnje ili dodavanja svježeg supstrata u bioreaktor. Porast pH vrijednosti na kraju bioprocesa najvjerojatnije je posljedica odumiranja biomase kvasca. Na kraju bioprocesa supstrat je gotovo u potpunosti utrošen pri čemu je proizvedeno ukupno 864,25 g etanola uz produktivnost bioprocesa od 0,66 g/L h te



Tablica 1. Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe
Table 1. Comparison between different cultivation techniques for bioethanol production from raw sugar beet juice

Proces / Process	t [h]	$m_{\Delta S}$ [g]	$m_{\Delta P}$ [g]	$Y_{P/S}$ [g/g]	E [%]	Pr[g/Lh]
Šaržni / Batch	114,5	807,1	302,45	0,375	69,70	0,53
Šaržni s pritokom supstrata / Fed batch	234,5	1170,0	587,96	0,502	93,40	0,50
Polukontinuirani / Repeated batch	260,5	2400,7	864,25	0,360	66,91	0,66

učinkovitost od 66,91 %. U odnosu na šaržni proces s pritokom supstrata nastalo je više etanola, ali je manji stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) i učinkovitost bioprocasa. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturom (Grba, 2010; Ogbonna i sur. 2001).

Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe

Na kraju ovog istraživanja izvršena je međusobna usporedba različitih tehnika vođenja procesa proizvodnje bioetanola na svježem soku šećerne repe na osnovi pokazatelja uspješnosti bioprocasa. Iz rezultata prikazanih u Tablici 1 vidljivo je da se stupanj konverzije supstrata u produkt za različite načine vođenja bioprocasa kreće u rasponu od 0,360 do 0,502 g/g, učinkovitost bioprocasa u rasponu od 66,91 do 93,40 %, a produktivnost procesa u rasponu od 0,50 do 0,66 g/Lh. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da šaržni proces s pritokom supstrata i polukontinuirani proces imaju veći potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji bioetanola u odnosu na klasični šaržni proces. Najveća učinkovitost i stupanj konverzije supstrata u produkt zabilježeni su kod šaržnog procesa s pritokom supstrata, a kod polukontinuiranog procesa najveća produktivnost bioprocasa. Navedeni rezultati također pokazuju da je nužna daljnja optimizacija polukontinuiranog načina vođenja proizvodnje bioetanola s ciljem povećanja stupnja konverzije supstrata u produkt i učinkovitosti bioprocasa.

4. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je svježi (rijetki) sok šećerne repe pogodna kompleksna hranjiva podloga za proizvodnju bioetanola s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* uz minimalnu korekciju sastava tj. dodatak izvora dušika i fosfora u obliku anorganske soli (npr. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Tijekom šaržnog procesa proizvodnje bioetanola stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) iznosio je 0,375 g/g, učinkovitost bioprocasa (E) 69,70 % te produktivnost (Pr) procesa 0,53 g/Lh. U šaržnom procesu s pritokom supstrata dobivene su ove vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa: $Y_{P/S} = 0,502$ g/g, $E = 93,40$ % i $Pr = 0,50$ g/Lh. Nadalje, tijekom polukontinuirane proizvodnje bioetanola pokazatelji uspješnosti bioprocasa imali su ove vrijednosti: $Y_{P/S} = 0,360$ g/g, $E = 66,91$ % i $Pr = 0,66$ g/Lh. Međusobna usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola jasno pokazuje da šaržni proces s pritokom supstrata i polukontinuirani proces imaju značajno veći potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji bioetanola iako je potrebna daljnja optimizacija polukontinuirane tehnike vođenja bioprocasa.

5. Literatura

- Balat M., Balat H., Öz H. C. (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.
- Cárdoma H. C., Sanchez, Ó.J. (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98, 2415-2457.
- Dias M.O.S., Ensinas A.V., Nebra S.A., Filho R.M., Rosell C.E.V., Wolf Maciel M.R. (2009) Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration of conventional bioethanol production process. *Chemical Engineering Research and Design*, 87, 1206-1216.
- Draycott A.P. (2006) *Sugar beet*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Glyn J. (2004) *Sugarcane*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Grba S. (2010) *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*, Plejada, Zagreb, Hrvatska.
- Henke J.M., Klepper G., Schmitz N. (2005) Tax exemption for biofuels in Germany: Is bio-ethanol really an option for climate policy? *Energy*, 30, 2617-2635.
- Henke S., Bubnik Z., Hinkova A., Pour V. (2006) Model of a sugar factory with bioethanol production in program Sugars. *Journal of Food Engineering*, 77, 416-420.
- Hinkova A., Bubnik Z. (2001) Sugar beet as a raw material for bioethanol production. *Czech Journal of Food Science*, 19, 224-234.
- Madson P.W., Monceaux D.A (2003) *Fuel ethanol production*. KATZEN International, Ohio, USA.
- Mills G.A., Ecklund E.E. (2007) Alcohols as components of transportation fuels. *Annual Review of Energy*, 12, 47-80.
- Marić V., Šantek B. (2009) *Biokemijsko inženjerstvo*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, Hrvatska.
- Ogbonna J.C., Mashima H., Tanaka H. (2001) Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*, 76, 1-8.
- Ricci M., Martini S., Bonechi C., Trabalzini L., Santucci A., Rossi C. (2004) Inhibition effects of ethanol on the kinetic of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modelling study. *Chemical Physics Letters*, 387, 377-382.
- Thomsen M.H., Thygesen A., Thomsen A.B. (2008) Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99, 4221-4228.
- Wenner C.E. (2003) Pasteur and Crabtree effects - assay in cells. *Methods in Enzymology*, 55, 289-297.
- Ward O.P., Singh A. (2002) Bioethanol technology: developments and perspectives. *Advances in Applied Microbiology*, 51 (2002) 53-80.