

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO – METALURŠKI FAKULTET

Valentina V. Semenčenko

**ISPITIVANJE RAZLIČITIH HIBRIDA KUKURUZA
KAO SIROVINE ZA PROIZVODNJU
BIOETANOLA, SKROBA I HRANE ZA ŽIVOTINJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Valentina V. Semenčenko

**INVESTIGATION OF VARIOUS MAIZE HYBRIDS
FOR BIOETHANOL, STARCH AND ANIMAL FEED
PRODUCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTOR:

Dr Ljiljana Mojović, redovni profesor
Tehnološko - metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor
Tehnološko - metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Milica Radosavljević, naučni savetnik
Instituta za kukuruz „Zemun Polje“

Dr Marija Milašinović Šeremešić, naučni saradnik
Instituta za kukuruz „Zemun Polje“

KANDIDAT:

Valentina Semenčenko, dipl. inž. tehnologije

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Mentoru prof. dr Ljljani Mojović dugujem veliku zahvalnost na razumevanju, podršci, dragocenoj pomoći i sugestijama tokom izrade ove disertacije, sumiranja i publikovanja rezultata istraživanja.

Posebno se zahvaljujem dr Milici Radosavljević na svestranoj pomoći, korisnim sugestijama i stručnim savetima koje mi je pružila tokom izrade ove disertacije kao i tokom dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada.

Hvala dr Mariji Milašinović-Šeremešić i prof. dr Slavici Šiler-Marinković na stručnim savetima koji su mi pomogli u uspešnoj izradi ove teze.

Zahvaljujem se Dušanki Terzić na velikoj podršci i pomoći tokom izrade ove disertacije, Danki Obradović, Miladinki Ranković i Snežani Jovanović koje su mi pomogle tokom eksperimentalnog rada.

Hvala dr Slađani Žilić od koje je i potekla ideja o izradi ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Vesni Dragičević, mr Miodragu Tolimiru i dr Životi Jovanoviću kao i brojnim kolegama iz Instituta za kukuruz koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Violeti Anđelković na ukazanoj prilici da laboratorijski deo istrživanja svoje doktorske disertacije realizujem u Instututu za kukuruz „Zemun Polje“.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezgraničnom razumevanju moralnoj, duhovnoj ali i materijalnoj podršci bez koje bi sve ovo bilo neizvodljivo.

Veliko hvala prijateljima koji su verovali u mene i koji su mi pružali podršku.

ISPITIVANJE RAZLIČITIH HIBRIDA KUKURUZA KAO SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA, SKROBA I HRANE ZA ŽIVOTINJE

REZIME

Bioetanol je biogorivo koje se širom sveta najviše koristi kao zamena za fosilna goriva. Trend proizvodnje ovog goriva je rastući, a kukuruz predstavlja jednu od najboljih obnovljivih sirovina za njegovu proizvodnju zahvaljujući visokom sadržaju skroba u znu. Suva džibra sa rastvorenim materijama (SDŽSRM) je najznačajniji sporedni proizvod procesa proizvodnje bioetanol iz kukuruza. Zahvaljujući visokoj hranljivoj vrednosti, sadržaju proteina i drugih hranljivih materija, predstavlja kvalitetno hranivo koje može naći primenu kao komponenta u smešama koje se koriste za ishranu životinja. Procesom mokrog mlevenja zrna kukuruza se osim skroba, koji je osnovni proizvod od velikog značaja za prehrambenu i druge industrije, dobijaju vredni sporedni proizvodi koji takođe mogu naći primenu u ishrani ljudi i životinja.

U teorijskom delu ove disertacije dat je sveobuhvatni prikaz svetskih trendova u proizvodnji bioetanol. Predstavljene su savremene tehnologije prerade kukuruza koje se koriste u proizvodnji ovog alternativnog goriva i skroba kao i inovacije koje se razvijaju u cilju poboljšanja efikasnosti i ekonomske isplativosti ovih postupaka.

Hibridi kukuruza stvoreni u Institutu za kukuruz "Zemun Polje" predstavljaju jedinstven polazni materijal za istraživanja mogućnosti proizvodnje bioetanol, skroba i hrane za životinje. Cilj ovih istraživanja bio je da se polazeći od drugačijih fizičkih karakteristika i hemijskog sastava hibrida standardnog kvaliteta zrna i hibrida specifičnih svojstava različite genetičke osnove utvrdi na koji način i u kojoj meri ova svojstva zrna utiču na prinose i kvalitet finalnih proizvoda.

Određena su fizička svojstva i hemijski sastav zrna ispitivanih hibrida kukuruza. Izvršena je optimizacija procesa enzimske hidrolize i alkoholne fermentacije brašna celog zrna odabranih hibrida kukuruza primenom enzima termostabilne α -amilaze Termamyl SC i glukoamilaze SAN Extra L, kao i proizvodnog mikroorganizma - kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Pri optimalnim reakcionim uslovima (odnos kukuruznog brašna i vode 1:3; koncentracija α -amilaze Termamyl SC 0,02% (v/w), glukoamilaze SAN Extra L 0,12% (v/w) i koncentracija inokuluma kvasca

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoideus* 2% (v/v); temperatura fermentacije 30°C) utvrđeno je adekvatno vreme trajanja fermentacije u cilju dobijanja što većeg prinosa etanola i uštede električne energije koji za modifikovani proces simultane saharifikacije i fermentacije iznosi 36h. Određeni su maksimalni prinosi bioetanola koji se mogu ostvariti fermentacijom ispitivanih hibrida. Ustanovljeno je da je hibrid ZP 434 dao najveći prinos bioetanola (94,5% od teorijskog sadržaja) u procesu odvojene hidrolize i fermentacije (SHF), kao i da veće prinose bioetanola mogu ostvariti hibridi standardnog hemijskog sastava zrna u odnosu na hibride specifičnih svojstava.

Statističkom analizom, na osnovu izračunatih koeficijenata korelacije ispitano je postojanje veze između pojedinih fizičkih i hemijskih parametara zrna i prinosa etanola. Zaključeno je da je prinos bioetanola iz celog zrna ispitivanih ZP hibrida kukuruza posledica delovanja više različitih faktora. Hemijski sastav i fizičke karakteristike zrna, kao i drugi parametri procesa proizvodnje uticali su na prinos bioetanola. Analizom hemijskog sastava i svarljivosti suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama ustanovljeno je da su sve džibre bile dobrog kvaliteta i da se kao takve mogu koristiti kao hranivo za pripremu potpunih i koncentrovanih smeša za ishranu životinja.

Ispitivane su i tehnološke karakteristike mokrog mlevenja zrna odabranih hibrida, odnosno prinos i kvalitet skroba kao i prinos sporednih proizvoda procesa mokrog mlevenja kukuruza (mekinje, gluten, klice, voda od močenja i procesna voda). Pored toga, određivan je sadržaj amiloze i amilopektina, odnosno odnos amiloze i amilopektina u skrobovima izolovanim iz različitih genotipova kukuruza.

Na osnovu proračuna energetske vrednosti bioetanola koji se može dobiti iz kilograma kukuruza, odnosno energije sagorevanja celog zrna, pojedinih komponenata zrna, kukuruznog oklaska i suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama ustanovljeno je da su ovi proizvodi bogati energijom što ukazuje na njihov kvalitet i potencijalnu primenu kukuruza kao energenta. Na osnovu prosečnih troškova proizvodnje kukuruza po hektaru, strukture i ukupnih troškova proizvodnje bioetanola, mogućih prihoda od sporednih proizvoda i prodaje ovog goriva u Srbiji izvršena je procena isplativosti proizvodnje bioetanola od kukuruza, po hektaru obradive površine kao i po kilogramu kukuruza. Utvrđeno je da bi se prodajom jednog litra etanola mogao ostvariti veći profit od onog koji se ostvaruje prodajom kilograma merkantilnog kukuruza. Međutim, s obzirom da je za proizvodnju jednog litra etanola u proseku potrebno 2,5 kg zrna kukuruza, na osnovu ovog proračuna se zaključuje da je u našoj zemlji po hektaru obradive površine veća isplativost od prodaje merkantilnog kukuruza.

Ključne reči: bioetanol, alternativno gorivo, kukuruz, skrob, dvojno-enzimska hidroliza, alkoholna fermentacija, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, hrana za životinje, energetska vrednost, ekonomska isplativost.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biotehnologija

UDK broj: 633.15 (043.3)

INVESTIGATION OF VARIOUS MAIZE HYBRIDS FOR BIOETHANOL, STARCH AND ANIMAL FEED PRODUCTION

ABSTRACT

Bioethanol is a biofuel that is mostly used as a replacement for fossil fuels worldwide. Trends of producing this alternative fuel are rising and maize is one of the best renewable raw materials for the production of fuel ethanol due to the high content of starch in the grain. Major by-product that arises from the fermentation process of corn is dried distillers' grains with solubles (DDGS). Due to its high feeding value, high protein and other valuable nutrients it represents an excellent component for livestock feed mixtures. Corn grain wet milling process produces apart from corn starch, which is the main product of great importance to the food and other industries, valuable by-products, which may also find their applications in human and animal nutrition.

In the theoretical part of this dissertation a comprehensive overview of global trends in the production of bioethanol was made. State of the art technologies of corn grain processing used in the production of this alternative fuel and starch, as well as innovations that are being developed in order to improve the efficiency and cost-effectiveness of these production processes were introduced.

Hybrids created in the Maize Research Institute "Zemun Polje" represent unique starting material for research of the possibilities of bioethanol, starch and animal feed production. The aim of this study was to, starting from different physical properties and chemical composition of standard and specialty hybrids of different genetic background, determine how and in which level do the grain characteristics affect the yield and quality of the final products.

The physical and chemical properties of grain corn hybrids were investigated. The optimization process of enzymatic hydrolysis and fermentation of whole grain flour obtained from the selected maize hybrids by using thermostable enzyme α -amylase Termamyl SC and glucoamylase SAN Extra L, as well as the production microorganism - yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* was conducted. Under optimal reaction conditions (ratio of corn flour and water 1:3, the concentration of α -amylase Termamyl SC 0.02% (v/w), glucoamylase SAN Extra L 0.12% (v/w) and inoculum concentration of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* 2% (v/v), fermentation temperature 30°C) adequate fermentation time for the modified process of simultaneous

saccharification and fermentation (SSF) was determined (36h) in order to obtain a higher yield of ethanol as well as electricity savings. Maximum ethanol yields that can be achieved by fermentation of certain hybrids were determined. Highest ethanol yield (94.5% of theoretical content) was obtained from whole grain flour of hybrid ZP 434 in the separate hydrolysis and fermentation process (SHF), and it was concluded that higher bioethanol yields can be achieved on standard hybrids in regard to the specialty hybrids.

Statistical analysis based on calculated correlation coefficients examined a link between certain physical and chemical parameters and ethanol yield. It was concluded that bioethanol yield was influenced by different factors. Chemical composition and physical properties of the whole kernel as well as other process parameters influenced the overall bioethanol yield. According to chemical composition and digestibility analysis of dried distillers' grains with solubles (DDGS), it was found that all samples meet the quality requirements of the components of animal feed and can be used in complete and concentrated feed mixtures.

Technological characteristics of corn grain wet milling process of the selected hybrids, i.e. the yield and quality of starch, as well as by-products (bran, gluten, germ, steep water and process water). In addition, amylose and amylopectin content, i.e. amylose and amylopectin ratio of the starches yield isolated from different maize genotypes were determined.

Based on calculations, energy values of ethanol that can be obtained from one kilogram of maize, or combustion energy, of whole grain, certain components of grain, corn cobs and DDGS, it was determined that these products are rich in energy which indicates their quality and potential use of maize as energy source. Based on the average costs of production per acre of corn grain, and total ethanol production costs, potential incomes from the sale of by-products of this fuel, evaluation the feasibility of bioethanol production compared to corn per hectare of arable land and per kilogram of maize in Serbia was conducted. It was found that profit from one liter of ethanol would be higher than from one kilogram of corn grain. However, because production of one liter of ethanol requires on average 2.5 kg of corn grain, according to calculations it can be concluded that production of corn grain per hectare of arable land would be more profitable in our country.

Key words: bioethanol, alternative fuel, maize, starch, two-step hydrolysis, alcoholic fermentation, yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, animal feed, energy value, economic viability.

Scientific field: Technological engineering

Scientific discipline: Biotechnology

UDC number: 633.15 (043.3)

SADRŽAJ

Konverzioni faktori i skraćenice korišćene u radu	
I TEORIJSKI DEO	1
UVOD	1
1. ETANOL KAO ALTERNATIVNO BIOGORIVO – ZNAČAJ I TRENDVI	5
1.1. Biomasa, biogoriva i bioetanol	5
1.2. Osnovne karakteristike bioetanola i poređenje sa drugim vrstama goriva	6
1.3. Proizvodnja i potrošnja bioetanola u svetu	12
1.4. Proizvodnja energije u Srbiji	18
1.4.1. Proizvodnja bioetanola u Srbiji	20
1.5. Ekološki i ekonomski aspekti primene bioetanola	23
2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA	28
2.1. Šećerne sirovine	29
2.2. Skrobne sirovine	30
2.3. Lignocelulozne sirovine	35
2.4. Sporedni proizvodi različitih tehnoloških postupaka	38
3. KUKURUZ KAO SIROVINA ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA, SKROBA I HRANE ZA ŽIVOTINJE	39
3.1. Kukuruz kao sirovina	39
3.2. Kukuruzni skrob	45
3.3. Tehnologije prerade zrna kukuruza	50
3.3.1. Suva prerada zrna kukuruza	50
3.3.2. Mokra prerada zrna kukuruza	53
4. TEHNOLOGIJE PROIZVODNJE BIOETANOLA	61
4.1. Osnovne faze proizvodnje bioetanola	61
4.2. Priprema skrobnih sirovina za alkoholnu fermentaciju	62
4.2.1. Hidroliza kukuruznog skroba	62
4.2.1.1. Dvojno-enzimski postupak hidrolize skroba	64
4.2.1.2. Enzimi koji katalizuju hidrolizu skroba	65
4.3. Alkoholna fermentacija	69
4.3.1. Faktori koji utiču na tok i efikasnost alkoholne fermentacije	69

4.3.2. Proizvodni mikroorganizmi	74
4.3.2.1. Kvasci	76
4.3.2.2. Bakterije	86
4.3.3. Tipovi proizvodnih postupaka fermentacije za sintezu bioetanola	90
4.4. Izdvajanje proizvoda	93
4.5. Sporedni proizvodi	97
4.5.1. Suva kukuruzna džibra	98
4.6. Proizvodnja bioetanola iz šećernih sirovina	107
4.7. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina	101
4.8. Inovacioni trendovi u procesima proizvodnje bioetanola	118
4.9. Hrana za životinje	122
II EKSPERIMENTALNI DEO	125
5. MATERIJAL I METODE RADA	125
5.1. Materijal	125
5.2. Metode	129
5.2.1. Određivanje fizičkih karakteristika kukuruznog zrna	129
5.2.2. Određivanje hemijskog sastava kukuruznog zrna	129
5.2.2.1. Metoda za određivanje sadržaja suve materije	129
5.2.2.2. Polarimetrijska metoda za određivanje sadržaja skroba	130
5.2.2.3. Određivanje sadržaja proteina metodom po Kjeldalu	133
5.2.2.4. Određivanje sadržaja ulja metodom po Soksletu	135
5.2.2.5. Određivanje sadržaja sirove celuloze	136
5.2.2.6. Određivanje sadržaja pepela	138
5.2.2.7. Određivanje svarljivosti suve materije <i>in vitro</i> enzimskom metodom (pepsin-celulazna metoda)	140
5.2.3. Izvođenje dvojno-enzimske hidrolize	143
5.2.4. Priprema laboratorijske kulture kvasca	144
5.2.5. Određivanje ukupnog broja ćelija kvasca Kohovom metodom agarne ploče	145
5.2.6. Izvođenje alkoholne fermentacije	147
5.2.7. Izvođenje postupka simultane saharifikacije i fermentacije (SSF)	148
5.2.8. Određivanje sadržaja redukujućih šećera u hidrolizatu	148
5.2.9. Određivanje sadržaja bioetanola	151
5.2.10. Određivanje kvaliteta suve kukuruzne džibre	152

5.2.11. Laboratorijska metoda mokrog mlevenja zrna kukuruza	161
5.2.12. Određivanje sadržaja amiloze i amilopektina	163
5.2.13. Korelaciona analiza	165
5.2.14. Proračun energetske vrednosti	165
5.2.15. Proračun troškova proizvodnje kukuruza i bioetanola	166
6. REZULTATI I DISKUSIJA	167
6.1. Fizičke karakteristike i hemijski sastav zrna ispitivanih hibrida kukuruza	167
6.1.1. Fizičke karakteristike zrna i klipa ispitivanih hibrida kukuruza	167
6.1.2. Hemijski sastav zrna ispitivanih hibrida kukuruza	171
6.2. Proizvodnja bioetanola od kukuruznog zrna	173
6.2.1. Optimizacija procesa dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza	173
6.2.1.1. Ispitivanje uticaja koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon utečnjavanja skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri različitim hidromodulima	173
6.2.1.2. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri konstantnoj koncentraciji enzima Termamyl SC i različitim hidromodulima	176
6.2.1.3. Parametri za proračun prinosa bioetanola	178
6.2.1.4. Određivanje optimalne koncentracije enzima Termamyl SC u fazi utečnjavanja skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri hidromodulu 1:3	180
6.2.1.5. Određivanje optimalne koncentracije enzima SAN Extra L u fazi ošećeranja skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri hidromodulu 1:3	183
6.2.1.6. Kinetika dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza	185
6.2.2. Alkoholna fermentacija hidrolizata skroba iz brašna celog zrna kukuruza	187
6.2.2.1. Kinetika procesa odvojene hidrolize i fermentacije i simultane hidrolize i fermentacije pod različitim uslovima procesa	188
6.2.2.2. Proizvodnja bioetanola postupkom odvojene hidrolize i fermentacije (SHF) skroba iz brašna celog zrna odabranih hibrida kukuruza	190
6.2.2.3. Proizvodnja bioetanola postupkom simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) skroba iz brašna celog zrna ispitivanih hibrida kukuruza	195
6.3. Mogućnosti iskorišćenja sporednog proizvoda procesa fermentacije - suve	202

kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama kao hraniva za životinje	
6.3.1. Ispitivanje kvaliteta suve kukuruzne džibre i mogućnosti njene primene kao hraniva za pripremu smeša za ishranu životinja	202
6.4. Tehnološke karakteristike mokrog mlevenja odabranih hibrida kukuruza	211
6.5. Energetski i ekonomski aspekti proizvodnje etanola iz hibrida kukuruza	217
ZAKLJUČAK	228
LITERATURA	232
PRILOG	260

Konverzioni faktori i skraćenice korišćene u radu

1 Å (angstrom) = 10^{-10} m

1 barrel sirove nafte = 158,9873 l

1 BTU = 1055,05585 J; BTU - skraćeno od *British Thermal Unit*, britanska toplotna jedinica, engl.;

1 bushell kukuruza = 25,4012 kg

1 gallon = 3,785 l

1 kcal = 4186,8 J

1 lb = 0,453592 kg

ADF – *acid detergent fibre*, vlakna nerastvorljiva u kiselom deterdžentu, engl.

ADL – *acid detergent lignin*, lignin nerastvorljiv u kiselom deterdžentu, engl.

ADP – adenzin difosfat

ATP – adenzin trifosfat

BEM – bezazotne ekstraktivne materije

BPK - biohemijska potrošnja kiseonika

CDS - *condensed distillers solubles*, kondenzovane rastvorene supstance, engl.

CFU – *colony forming unit*, broj oformljenih kolonija, engl., predstavlja procenjeni broj kolonija vijabilnih mikroorganizama

CSL - *corn steep liquor*, koncentrovani kukuruzni ekstrakt, engl.

DDG - *dried distillers' grains*, suva džibra, engl.

DDGS - *dried distillers' grains with solubles*, suva džibra sa rastvorenim materijama, engl.

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

NAD⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid

NADP⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NDF – *neutral detergent fibre* – vlakna nerastvorljiva u neutralnom deterdžentu, engl.

OIE – obnovljivi izvori energije

RNK – ribonukleinska kiselina

SDžSRM – suva džibra sa rastvorenim materijama

TSAA - *Total Sulfur Amino Acid*, ukupne aminokiseline koje sadrže sumpor, engl.

Predstavlja koncentraciju metionina u odsustvu cisteina.

I TEORIJSKI DEO

UVOD

Bioetanol je tečno biogorivo koje se dobija procesom fermentacije iz biomase. Širom sveta se najviše koristi kao zamena za fosilna goriva. Zalihe neobnovljivih izvora energije su ograničene i imaju značajan negativni uticaj na životnu sredinu, kao što je povećanje emisije gasova staklene bašte (Mojović i sar., 2009). Značaj bioetanola za životnu sredinu ogleda se u redukovanju ukupne emisije CO₂, jednog od gasova staklene bašte koji utiču na globalno zagrevanje. Ukupni bilans CO₂ je u procesu sagorevanja bioetanola jednak nuli, jer biljke za fotosintezu potroše količinu ovog gasa jednaku onoj koja nastane u toku sagorevanja etanola (Mojović i sar., 2007). Ova činjenica je veoma važna sa tačke gledišta Konferencije o klimatskim promenama Ujedinjenih nacija, održane u Kopenhagenu u decembru 2009. godine, čiji je jedan od glavnih zaključaka bio da globalno zagrevanje ne sme premašiti 2°C do 2020. godine.

Prema izveštaju Svetskog udruženja za obnovljiva goriva (Global Renewable Fuels Alliance - GRFA) u saradnji sa F.O. Lichtom, svetska proizvodnja bioetanola je u toku 2012. godine iznosila 85,2 milijarde litara (Renewable Fuels Association - RFA, 2012.b). Uprkos slabljenju ekonomije Kine i negativnog ekonomskog rasta, GRFA je predvidela rast od 1% u proizvodnji etanola u odnosu na 84,5 milijardi litara proizvedenih 2011. godine. Godišnja svetska proizvodnja je prema GRFA premašila 563 miliona barela etanola godišnje.

Ono što bioetanol stavlja ispred ostalih obnovljivih izvora energije u ovom trenutku je činjenica da se kompletna postojeća naftna infrastruktura može iskoristiti i za distribuciju biogoriva, i da biogorivo može bez problema (ili uz neznatne modifikacije) da sagoreva u benzinskim odnosno dizel motorima (Semenčenko i sar., 2009).

Sjedinjene Američke Države (SAD), Brazil i nekoliko članica Evropske unije (EU) imaju najznačajnije programe za podsticanje proizvodnje biogoriva u Svetu. Uz podršku novih vladinih programa u Americi, Aziji i Evropi, ukupni globalni zahtevi za biogorivima mogli bi premašiti 125 milijardi litara do 2020. godine (Demirbas, 2007).

Bioetanol i smeše bioetanola i benzina koristile su se još od same pojave motora sa unutrašnjim sagorevanjem. U Brazilu je komercijalna primena bioetanola, dobijenog iz šećerne trske, započela još 1925. godine. Od osamdesetih godina dvadesetog veka

značajno se povećalo interesovanje za ovo gorivo. Osim što manje zagađuje životnu sredinu izduvnim gasovima, bioetanol ima i veći oktanski broj u odnosu na benzin (108), veću toplotu isparavanja i manju toplotu sagorevanja (Mojović i sar., 2006). Bioetanol se može koristiti kao čist alkohol (u posebno konstruisanim motorima) ili u smeši sa benzinom (E5, E10, E85). Smeše sa nižim zapreminskim udelom bioetanol sa kompatibilne sa konvencionalnim motorima, dok smeše sa više od 30% etanola zahtevaju modifikaciju motora. S obzirom da etanol u molekulu sadrži kiseonik, omogućeno je kompletnije sagorevanje komponenata benzina, redukovanje količine ugljen-monoksida, toksičnih supstanci kao što su benzeni, i smanjenje nivoa ugljovodonika koji ne sagorevaju (Mojović i sar., 2007).

Ratifikacijom Ugovora o osnivanju energetske zajednice (Coordinating European Council - CEC, 2006), Srbija je, između ostalog, prihvatila obavezu primene direktive 2001/77/EC o promovisanju proizvodnje električne energije iz obnovljivih izvora energije i direktive 2003/30/EC o promovisanju korišćenja biogoriva i drugih goriva iz obnovljivih izvora energije u sektoru saobraćaja, kako bi se obezbedilo pojavljivanje određene količine biogoriva na tržištu – 5,75% od ukupne količine goriva koje se koristi u saobraćaju do kraja 2010. godine. Ova direktiva je u skladu sa Kjoto sporazumom potpisanim 1997. godine sa ciljem da se smanji emisija gasova koji doprinose efektu staklene bašte, čiji je i Srbija potpisnik. Međutim, 2009. godine Evropska komisija je donela novu Direktivu 2009/28/EC, kojom je utvrđeno promovisanje korišćenja energije iz obnovljivih izvora. Ova Direktiva menja i, sledstveno tome, ukida Direktive 2001/77/EC i 2003/30/EC, a utvrđuje zajednički okvir za promovisanje energije iz obnovljivih izvora. U njoj su postavljeni obavezani nacionalni ciljevi za sveukupni udeo energije iz obnovljivih izvora u finalnoj bruto potrošnji energije i za udeo obnovljivih izvora u saobraćaju: najmanje 20% učešća energije iz obnovljivih izvora u finalnoj bruto potrošnji energije u Zajednici i 10% učešća energije iz obnovljivih izvora u potrošnji energije za saobraćaj svake Zemlje članice do 2020. godine. Osim toga, ustanovljeni su kriterijumi održivosti za biogoriva i tečna biogoriva. Srbija je usvojila ovu direktivu i ona je ugrađena u Akcioni plan za biomasu koji je usvojen 2010. godine.

Iako se bioetanol decenijama proizvodi iz skrobnih i šećernih sirovina, korišćenje obradivih površina i useva namenjenih prvenstveno ishrani za proizvodnju ovog goriva prouzrokovalo je da se danas intenzivno razvijaju tehnologije za dobijanje

bioetanola iz lignoceluloznih izvora biomase kao što su šumski, poljoprivredni i komunalni otpad.

Kao visoko prinosa ugljenohidratna biljka kukuruz je veoma kompetetivan u odnosu na ostala žita (Milašinović i sar., 2007). Kukuruzno zrno sadrži u proseku oko 70% skroba i najznačajnija je sirovina za proizvodnju komercijalnog skroba. U savremenim procesima prerade kukuruza tehnološku vrednost zrna najvećim delom opredeljuju tipovi endosperma zbog čega je od posebnog značaja uočiti razlike u fizičkim karakteristikama i hemijskom sastavu hibrida sa različitim osobinama endosperma. Kukuruzni skrob kao osnovni proizvod primarne skrobarske prerade predstavlja polaznu sirovinu za brojne procese transformacije u daljoj industrijskoj proizvodnji, odnosno višim fazama skrobarske prerade. Stoga, danas postoji čitav niz proizvoda koji se dobijaju iz kukuruznog skroba.

Istraživanja kvaliteta i tehnološke vrednosti zrna predstavljaju doprinos boljoj valorizaciji kukuruza u industrijskoj preradi, koja je u našoj zemlji skoro simbolično zastupljena, a pre svega u proizvodnji visokovredne hrane i tehničkih proizvoda što ima za cilj povećanje ekonomske vrednosti ove, za našu zemlju najznačajnije, prirodno obnovljive ugljenohidratne sirovine.

Kukuruzna džibra predstavlja važan nusproizvod u proizvodnji bioetanola. Tokom proizvodnje etanola iz kukuruza, na 1000 kg utrošenog kukuruza sa 12% vlage i 65% skroba (preračunato na suhu materiju), nastaje 229 kg džibre sa 90% suve materije. Pri tom se dobija 293 kg etanola (Mojović i sar., 2007). Sveža džibra se može koristiti za stočnu hranu na farmama u neposrednoj blizini fabrike etanola, jer je vrlo podložna kvarenju. Za razliku od nje, osušeni proizvod je stabilan i može se koristiti kao komponenta stočne hrane tokom cele godine.

Osnovni cilj ove disertacije bio je da se ispituju fizička svojstva, hemijski sastav i podobnost zrna ZP hibrida kukuruza različite genetičke osnove za proizvodnju bioetanola, skroba i hrane za životinje. U prvom delu eksperimentalnog rada cilj je bio da se utvrde fizička svojstva i hemijski sastav zrna ZP hibrida kukuruza namenjenih za ova istraživanja, zatim, da se izvrši optimizacija procesa enzimske hidrolize i alkoholne fermentacije primenom enzima termostabilne α -amilaze Termamyl SC i glukoamilaze SAN Extra L, pri optimalnij koncentraciji inokuluma proizvodnog mikroorganizma - kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Kao sirovina korišćeno je brašno celog zrna odabranih ZP hibrida kukuruza standardnog hemijskog sastava i specifičnih svojstava. Pri optimalnim reakcionim uslovima određeno je adekvatno vreme trajanja

fermentacije u cilju dobijanja što većeg prinosa bioetanola i uštede električne energije. Pri optimalnim parametrima procesa ispitana je i definisana kinetika reakcije dvojnjenzimske hidrolize i procesa fermentacije.

Cilj rada je takođe bio da se odrede maksimalni prinosi bioetanola koji se mogu ostvariti fermentacijom brašna celog zrna odabranih hibrida. Na osnovu ostvarenih prinosa bioetanola utvrđeno je koji ZP hibridi predstavljaju najbolje sirovine za proizvodnju bioetanola. Statističkom analizom, na osnovu izračunatih koeficijenata korelacije ispitivano je postojanje veze između pojedinih fizičkih i hemijskih parametara zrna i prinosa bioetanola. Analiziran je hemijski sastav suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama, sporednog proizvoda procesa dobijanja bioetanola iz hidrolizata kukuruznog brašna genetički različitih ZP hibrida kukuruza. Pored osnovnih pokazatelja kvaliteta (sadržaj vlage, pepela, celuloze, fosfora i proteina) određivana je i svarljivost suve materije džibre enzimskom *in vitro* metodom.

U drugom delu istraživanja ove disertacije cilj je bio da se odredi prinos i kvalitet skroba kao i prinos sporednih proizvoda procesa mokrog mlevenja kukuruza (mekinje, gluten, klica, voda od močenja i procesna voda). Određivan je sadržaj amiloze i amilopektina u skrobu izolovanom iz zrna različitih ZP genotipova kukuruza. Takođe je ispitivana svarljivosti skroba različitih ZP genotipova kukuruza enzimskom *in vitro* metodom. Statističkom analizom na osnovu vrednosti koeficijenata korelacije ispitivano je postojanje veze između pojedinih parametara.

U trećem delu istraživanja vršen je proračun energetske vrednosti bioetanola koji se može dobiti iz kilograma kukuruza, odnosno energije sagorevanja izražene u MJ. Zatim je određivana energetska vrednost celog zrna, pojedinih komponenata zrna, kukuruznog oklaska (koćanke) i sporednog proizvoda procesa dobijanja bioetanola – suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama. Potom su izračunati prosećni troškovi proizvodnje merkantilnog kukuruza po hektaru, zasnovani na cenama pojedinih predsetvenih i setvenih operacija, određena struktura i ukupni troškovi proizvodnje bioetanola, mogući prihodi od sporednih proizvoda kao i od prodaje ovog goriva u našoj zemlji. Na osnovu toga je izvršena procena isplativosti proizvodnje bioetanola u odnosu na merkantilni kukuruz, po hektaru obradive površine kao i po kilogramu merkantilnog kukuruza.

1. ETANOL KAO ALTERNATIVNO BIOGORIVO – ZNAČAJ I TRENDVI

1.1. Biomasa, biogoriva i bioetanol

Biomasa kao izvor obnovljive energije, je organska supstanca biljnog ili životinjskog porekla (drvo, slama, biorazgradivi ostaci iz poljoprivredne proizvodnje, stajsko đubrivo, organski deo komunalnog čvrstog otpada). Biomasa se koristi u procesima sagorevanja ili konvertuje u sistemima koji proizvode toplotnu energiju, električnu energiju ili i toplotnu i električnu. Osim toga, biomasa se koristi za proizvodnju tečnih i gasovitih goriva – bioetanola, biodizela i biogasa.

Biogoriva se dobijaju konverzijom biomase i predstavljaju obnovljive izvore energije koji se mogu koristiti kao zamena za naftne derivate (Demirbas, 2009). Sam pojam biogorivo odnosi se na čvrsta (biougalj), tečna (bioetanol, biljno ulje i biodizel) ili gasovita (biogas, biosingas i biovodonik) goriva koja se u najvećoj meri proizvode od biomase (Demirbas, 2008). U biogoriva se ubrajaju: bioetanol, biodizel, biogas, biometanol, biodimetiletar, bio-ETBE, bio-MTBE, sintetička biogoriva, biovodonik i čisto biljno ulje.

U biogoriva prve generacije spadaju goriva proizvedena konvencionalnim tehnološkim postupcima od skrobnih i šećernih sirovina, biljnih ulja i životinjskih masti. Biogoriva druge generacije proizvode se od lignoceluloznih sirovina i otpadnih materija, odnosno sirovina koje se tradicionalno ne koriste kao hrana. Proizvodnja treće generacije biogoriva zasniva se na korišćenju algi kao bioreaktora za sintezu etanola ili ulja od koga se potom dobija biodizel.

Bioetanol je alternativno gorivo koje se dobija fermentacijom iz obnovljivih sirovina - fermentacijom šećera prisutnih u biomasi ili šećera dobijenih prethodnom konverzijom sastojaka biomase. Sirovine koje se najčešće koriste u proizvodnji etanola su kukuruz, šećerna trska, šećerna repa, slatki sirak. S obzirom da se bioetanol koristi kao zamena za fosilno gorivo ili kao dodatak motornom benzinu, ovo gorivo predstavlja jednu od strateški važnih sirovina. Etanol se smatra obnovljivim izvorom energije jer se dobija iz biljnih sirovina koje sadrže skrob ili druge ugljene hidrate a nastaju od ugljen-dioksida i sunčeve svetlosti, koji se ne mogu iscrpeti. U toku fotosinteze, biljke izdvajaju ugljen-dioksid pomoću sunčeve svetlosti, proizvodeći glukozu i skrob za

energiju rasta. Biljke se potom koriste kao sirovine za proizvodnju ovog alkohola (Gnansounou 2009).

Istorija etanola kao goriva datira od 1826. godine, kada je Semjuel Mori (Samuel Morey) konstruisao motor koji radi na etanol i terpentini (Gnansounou, 2009). Bioetanol i smeše bioetanola i benzina koristile su se još od same pojave motora sa unutrašnjim sagorevanjem. Prvi automobil koji je mogao da radi na benzin ili čisti alkohol „Model T Ford“, konstruisala je kompanija „Ford Motor Automobile“ 1908. godine. Henri Ford (Henry Ford) koji je dizajnirao ovaj čuveni automobil tvrdio je da je etanol „gorivo budućnosti“ (Freudenberger, 2009.a). U Brazilu je komercijalna primena bioetanola, dobijenog iz šećerne trske, započela još 1925. godine. Prva fabrika bioetanola u Sjedinjenim Američkim Državama sagrađena je četrdesetih godina dvadesetog veka kako bi snabdevala američku vojsku gorivom. Iako ovi rani naponi da se etanol uvede kao gorivo nisu urodili plodom zbog niskih cena benzina, prekid u snabdevanju naftom na Bliskom Istoku i zabrinutost zbog zagađenja uzrokovanog upotrebom olova za povećanje oktanskog broja benzina, obnovili su interesovanje za etanol krajem sedamdesetih godina dvadesetog veka (Freudenberger, 2009.a). Od osamdesetih godina dvadesetog veka značajno se povećalo interesovanje za ovo gorivo. Proizvodnja etanola u SAD porasla je od 662 miliona litara 1980. godine na 50,1 milijardu litara tokom 2010. (RFA, 2011).

1.2. Osnovne karakteristike bioetanola i poređenje sa drugim vrstama goriva

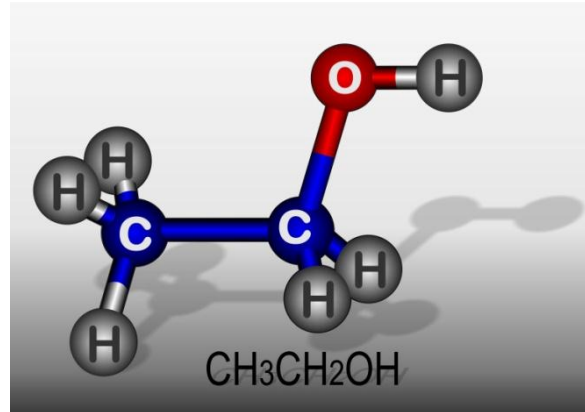
Etanol (etil-alkohol, alkohol, C_2H_5OH) je bistra, bezbojna, isparljiva, lako zapaljiva tečnost, karakterističnog mirisa. Gori bledoplavim plamenom. Nastaje procesom vrenja, fermentacijom glukoze. Zbog ugljen-dioksida koji se izdvaja u toku fermentacije izgleda kao da tečnost vri i odatle potiče naziv – vrenje. Najviše se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i industriji goriva (Lee, 2007; Piletić i sar., 1992).

U zavisnosti od kvaliteta postoje:

- denaturisani etanol (88 vol. %), primenjuje se za loženje i osvetljenje;
- industrijski etanol (96,5 vol. %), koristi se u industriji za tehničke svrhe, kao rastvarač, gorivo i kao sirovina u proizvodnji velikog broja hemijskih proizvoda;

- fini etanol (96,0-96,5 vol. %) koristi se u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji i za proizvodnju nekih alkoholnih pića;
- apsolutni etanol (99,7-99,8 vol. %) je termin za bezvodni etanol koji se koristi u farmaceutske svrhe i kao gorivo (ili oksigeni dodatak gorivima) (Baras i sar., 1996).

Na slici 1.1 prikazan je trodimenzionalni model molekula etanola.



Slika 1.1. Trodimenzionalni prikaz molekula etanola

Bioetanol se najčešće koristi u smeši sa benzinom, dobijenim rafinerijskom preradom sirove nafte. Može se koristiti kao supstituent motornom benzinu ili se može konvertovati do ETBE (etil-tercijarni butiletar) i kao takav dodavati benzinu ili dizel gorivu u koncentraciji do 15%. Kao dodatak gorivu koristi se isključivo visoko prečišćeni – apsolutni etanol. Svaka zemlja ima standarde za kvalitet etanola namenjenog za dodavanje benzinu ili dizel gorivu. U Evropskoj uniji kvalitet namešanog motornog goriva potrebno je da ispunjava zahteve kvaliteta motornih benzina koji su predviđeni evropskim standardima (EN 228). U ovim standardima su data ograničenja za sadržaj: vode, metanola, aldehida, sumpora, fosfora, viših alkohola, bakra, hlorida i sredstava za denaturisanje, kao i zahtevi za gustinom, bistrinom i pH vrednošću.

Bioetanol koji je namenjen za smeše sa fosilnim gorivom mora imati minimalnu čistoću od 99,5% do 99,8% vol. u zavisnosti od standarda zemlje u kojoj se proizvodi (Mojsavić i sar., 2007). Bioetanol se može mešati u različitim proporcijama sa motornim benzinom ili dizelom. Naime, bioetanol se lakše meša sa benzinom nego sa dizel gorivom, pa su zbog toga za spravljanje dizehola (smeša sa više od 3% bioetanola) potrebni specijalni emulgatori. Najpoznatije smeše su (Nikolić, 2009):

- **Smeše sa niskim udelom bioetanola u fosilnom gorivu:** To su smeše motornog benzina i bioetanola u udelu od 5 do 22% (označava se kao E5-E22G). U SAD-u etanol se trenutno meša sa benzinom u razmeri 1:9 da bi se dobila E10 smeša benzina koja se može koristiti za pogon konvencionalnih automobila bez ikakvih izmena motora. Takođe je moguće mešati 10-15% bioetanola (uz dodatak specijalnih aditiva) sa dizel gorivom. Takvo dizel gorivo se naziva oksidizel i označava se kao E10D i E15D. Sve ove smeše se mogu koristiti u konvencionalnim motorima bez modifikacija.
- **Smeše sa visokim udelom bioetanola u fosilnom gorivu:** U ovim smešama se sadržaj bioetanola kreće oko 85% (E85G). Za njihovo korišćenje su potrebne modifikacije motora i nalaze primenu za pogon takozvanih "flex-fuel" vozila koja su projektovana da izdrže visoke koncentracije etanola (Gnansounou, 2009).
- **Bio-ETBE:** Ovo gorivo se može koristiti u smešama od 10 do 15% u konvencionalnim motorima bez modifikacija.

U tabelama 1.1. i 1.2. prikazane su fizička i hemijska svojstva kao i specifične karakteristike bioetanola u poređenju sa drugim vrstama goriva.

Tabela 1.1. Uporedni prikaz svojstava bioetanola, benzina i dizela (U.S. Department of Energy, 2013)

Svojstvo	Etanol	Benzin	Dizel (D2)
Hemijski sastav/formula	C ₂ H ₅ OH	C ₄ - C ₁₂	C ₃ - C ₂₅
Molekulska masa, g·mol ⁻¹	46,07	100–105	≈200
Ugljenik, mas. %	52,2	85–88	84–87
Vodonik, mas. %	13,1	12–15	33–16
Kiseonik, mas. %	34,7	0	0
Sadržaj sumpora, ppm	0	30-80	10-50
Gustina (15°C), kg·l ⁻¹	0,796	0,72–0,78	0,81–0,89
Tačka ključanja, °C	78,37	26,67–225	187,78–343,33
Napon pare, kPa	15,86	55,16-103,42	
Oktanski broj	108	90–100	--
Cetanski broj	--	5–20	40–55
Tačka mržnjenja, °C	-114	-40	-40 - -1,11
Temperatura paljenja, °C	12,78	-42,78	73,89
Temperatura samopaljenja, °C	422,78	257,22	≈315
Latentna temperatura isparavanja, kJ l ⁻¹	110,36	41,80	
Viša toplotna moć (tečno gorivo-tečna voda) MJ kg ⁻¹	29,77	43,73–47,45	44,66–46,52
Niža toplotna moć (tečno gorivo-vodena para) MJ kg ⁻¹	26,75	41,87–44,19	41,87–44,19
Viša toplotna moć (tečno gorivo-tečna voda) MJ l ⁻¹	23,44	34,78	38,66
Niža toplotna moć (tečno gorivo-vodena para) MJ l ⁻¹	21,18	32,05	35,78
Specifični toplotni kapacitet, (15°C) kJ·(kg K) ⁻¹	2,38	2,01	1,80
Stehiometrijski odnos vazduh/gorivo, kg kg ⁻¹	9	14,7	14,7

Tabela 1.2. Poređenje svojstava različitih vrsta goriva (AFDC, 2013)

	Benzin	Dizel (D2)	Biodizel	Propan	Komprimovani prirodni gas	Tečni prirodni gas	Etanol	Metanol	Vodonik	Električna energija
Hemijski sastav	C ₄ do C ₁₂	C ₈ do C ₂₅	Metil estri masnih kiselina C ₁₂ do C ₂₂	C ₃ H ₈ (veći deo) i C ₄ H ₁₀ (manji deo)	CH ₄ (83-99%), C ₂ H ₆ (1-13%)	CH ₄	CH ₃ CH ₂ OH	CH ₃ OH	H ₂	/
Sastav goriva/ proizvodna sirovina	Nafta	Nafta	Sojino ulje, korišćeno ulje za kuvanje, životinjske masti i uljana repica	Nusprodukt rafinisanja benzina ili prerade zemnog gasa	Podzemne zalihe	Podzemne zalihe	Kukuruz, žitarice, poljoprivredn i otpad (celuloza)	Zemni gas, ugalj, drvena biomasa	Zemni gas, metanol, elektroliza vode	Ugalj, zemni gas, nuklearna, hidroelektrič-na, energija vetra i sunca
Ekvivalent galonu benzina	100%	1 galon D2= 113% energije galona benzina	1 galon B100 = 103% energije galona benzina= 93% energije galona D2 B20=109% energije galona benzina= 99% energije galona D2	1 galon propana= 73% energije galona benzina	2,6 kg komprimovanog prirodnog gasa=100% energije galona benzina	1 galon tečnog prirodnog gasa=64% energije galona benzina	1 galon E85= 73% - 83% energije galona benzina (varira zbog sadržaja etanola u E85) 1 galon E10= 96,7% energije galona benzina	1 galon metanola= 49% energije galona benzina	1 kg H ₂ = 100% energije galona benzina	33,70 kWh=100% energije galona benzina
Energija sagorevanja (niža toplotna moć)	32,35 MJ l ⁻¹	35,80 MJ l ⁻¹	33,32 MJ l ⁻¹ za B100	23,67 MJ l ⁻¹	5,65 MJ l ⁻¹	20,82 MJ l ⁻¹	21,27 MJ l ⁻¹ E100	15,96 MJ l ⁻¹	14,38 MJ l ⁻¹	3,60 MJ (kWh) ⁻¹
Energija sagorev. (viša topl. moć)	34,65 MJ l ⁻¹	38,29 MJ l ⁻¹	35,66 MJ l ⁻¹ za B100	25,48 MJ l ⁻¹	6,26 MJ l ⁻¹	23,64 MJ l ⁻¹	23,56 MJ l ⁻¹ E100	18,17 MJ l ⁻¹	17,00 MJ l ⁻¹	3,60 MJ (kWh) ⁻¹

Ispitivanje različitih hibrida kukuruza kao sirovine za proizvodnju bioetanola, skroba i hrane za životinje

Agregatno stanje	Tečno	Tečno	Tečno	Tečnost pod pritiskom	Komprimovani gas	Pohtladena (kriogena) tečnost	Tečno	Tečno	Komprimovani gas ili tečnost	Elektricitet
Cetanski broj	/	40-55	48-65	/	/	/	0-54	/	/	/
Oktanski broj	84-93	/	/	105	120+	120+	110	112	130+	/
Temperatura paljenja (iskre)	-42,78 °C	73,89 °C	100 do 170 °C	-73,33 do -101,11 °C	-184,44 °C	-187,78 °C	12,78 °C	11,11 °C	/	/
Temperatura samopaljenja	257,22 °C	~315 °C	~150 °C	454,44 do 510 °C	540 °C	540 °C	422,78 °C	480,56 °C	565,56 do 582,22 °C	/
Problemi i prednosti prilikom korišćenja			Smeše sa većim procentom mogu oštetiti creva i zaptivače. Lubrikacija je bolja nego kod standardnog dizel goriva.	Kod nekih vozila se produžava rok trajanja za za 2-3 godine, kao i duži periodi između redovnih održavanja (popravki).	Boce pod pritiskom zahtevaju periodičnu proveru i sertifikaciju.	Boce pod pritiskom zahtevaju periodičnu proveru i sertifikaciju.	U nekim slučajevima su potrebni specijalni lubrikanti. U praksi se ponašaju veoma slično ili identično kao konvencional na goriva.	Moraju se koristiti specijalni lubrikanti prema preporuci proizvođača kao i kompatibilni rezervni delovi M-85.	Upotreba vodoničnog goriva u motornim rezervoarima zahteva minimalno održavanje.	Zahteva manje održavanja od benzila i dizela. Nisu potrebna redovna podešavanja, promena ulja, zupčastih kaiševa, pumpe za vodu, hladnjaka niti dizni za ubrizgavanje goriva. Verovatno je potrebna povremena zamena akumulatora.

Bioetanol ima veći oktanski broj od običnog benzina (tabela 1.1). Oktanski broj je merilo kvaliteta goriva i bazira se na sposobnosti goriva da sagoreva ravnomerno, tj. bez detonacija. Meri se u odnosu na oktan (komponentu benzina) kao standard. Vrednost oktanskog broja za izooktan (2,2,4-trimetil pentan) je 100, a n-heptana 0. Pojava detonacije praćena je lupanjem u cilindru motora, a može doći i do zapaljenja smeše. Samozapaljenje je nepoželjno jer stvara veliki pritisak i lokalizovanu toplotu u motoru, koja prouzrokuje veliko opterećenje na komponentama motora i može čak probušiti rupe u klipu (Freudenberger, 2009.b).

S obzirom da etanol u molekulu sadrži kiseonik, sagorevanje komponenata benzina je potpunije, smanjena je emisija ugljen-monoksida, toksičnih supstanci kao što su benzeni, i nivoa ugljovodonika koji ne sagorevaju (Mojović i sar., 2007).

Performanse vozila (snaga, ubrzanje, putna brzina) su slične kao i kod pogona na čist benzin, ali se zbog manje toplotne moći smanjuje radijus kretanja (pređeni put sa jednim litrom goriva) za oko 28%. Rafinerije su nakon izbacivanja olova iz fosilnih goriva počele da dodaju oksigenatne aditive u cilju povećanja oktanskog broja goriva. U tu svrhu dodavani su alkoholi i etri (benzen, ksilen i toluen), pri čemu su etri veoma toksični za okolinu. Za razliku od njih, bioetanol predstavlja odličan, netoksičan dodatak kojim se može povećati oktanski broj fosilnih goriva. Takođe, i ETBE se u nižim koncentracijama (do 15%) može koristiti kao oksigenator za povećanje oktanskog broja a i kao zamena za toksičan MTBE (metil-tercijarni butiletar). Pored povećanja oktanskog broja, ova dva oksigenantna aditiva poboljšavaju i termičku efikasnost paljenja motora i smanjuju zagađenost izduvnih gasova ostvarujući bolje sagorevanje u motoru (Nikolić, 2009; Mojović i sar., 2007).

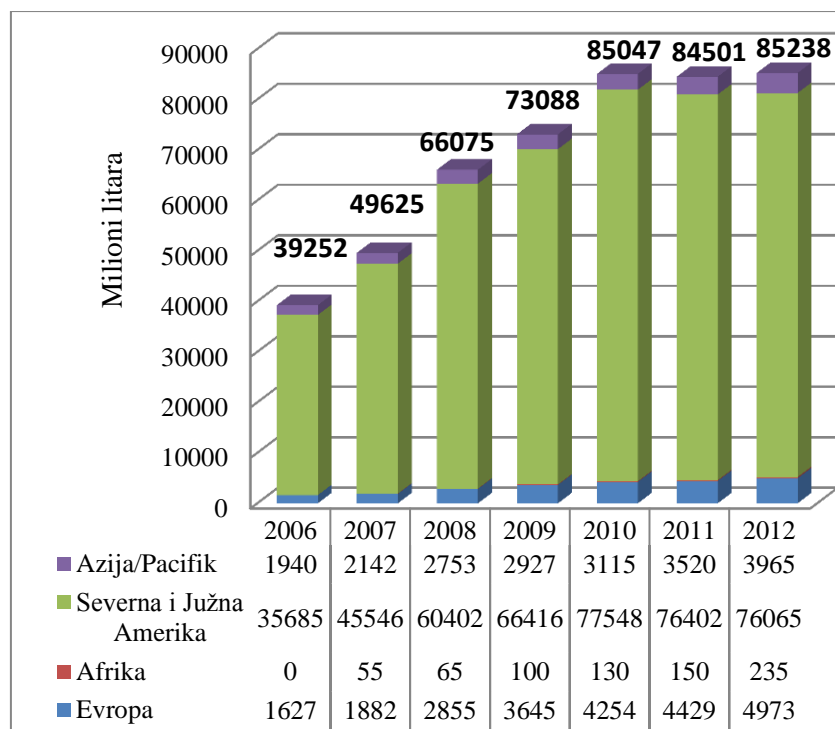
Motorna vozila koja rade na bioetanol mogu imati poteškoće prilikom paljenja na temperaturama nižim od 1°C. Temperatura paljenja etanola i latentna toplota isparavanja (tabela 1.1) su znatno više nego kod benzina, tako da je alkoholno gorivo manje isparljivo što može izazvati poteškoće prilikom startovanja motora na niskim temperaturama (Medić, 2011). Smeša E85 bioetanola sadrži dovoljno benzina da bi se motor pokrenuo bez dodatka antifrizu (Freudenberger, 2009.b). Dodatak bioetanola gorivu onemogućava formiranja leda u karburatorima na temperaturama ispod 0°C (dodavanjem 2-4% etanola u benzin).

Smeše sa nižim zapreminskim udelom bioetanola su kompatibilne sa konvencionalnim motorima, dok smeše sa više od 30% etanola zahtevaju modifikaciju motora. Etanol ima sposobnost da korodira metalne delove i razgrađuje meke komponente automobilskih motora, što je posledica prisustva vode u etanolu. Takođe može doći do nagrizanja gumenih delova. Kretanjem jona kroz vodu stvara se struja koja ima sposobnost da lagano rastvara metale kao što su legure aluminijuma ili cinka (Freudenberger, 2009.b).

U januaru 2011. godine Agencija za zaštitu životne sredine SAD (U.S. Environmental Protection Agency – EPA) odobrila je upotrebu E15 smeša etanola i benzina u automobilima, kamionima i kombijima proizvedenim od 2001. godine i kasnije, kao i novijim „flex-fuel“ vozilima. Vozila koja su proizvedena posle 2001. godine, manja motorna vozila, čamci i motocikli i dalje ne smeju da koriste E15 gorivo. Primena smeša etanola i benzina se sve više podstiče. U SAD trenutno postoji preko 2860 benzinskih pumpi na kojima se prodaje E85 gorivo, kao i brojne benzinske stanice na kojima kupac može sam da izabere odnos etanola i benzina u svojoj smeši goriva (od E10 do E85) (RFA, 2012.a).

1.3. Proizvodnja i potrošnja bioetanola u svetu

Prema izveštaju Svetskog udruženja za obnovljiva goriva (GRFA) u saradnji sa i F.O. Lichtom, svetska proizvodnja bioetanola je u toku 2012. godine iznosila 85,2 milijarde litara (RFA, 2012.b) (slika 1.2). Uprkos slabljenju ekonomije Kine i negativnog ekonomskog rasta, GRFA je predvidela rast proizvodnje etanola od 1% u odnosu na 84,5 milijardi litara proizvedenih 2011. godine. Godišnja svetska proizvodnja je prema GRFA premašila 563 miliona barela etanola.



Slika 1.2. Proizvodnja bioetanola u svetu u periodu 2006-2012. godine (prema podacima F.O. Lichta objavljenim na sajtu GRFA, 2012)

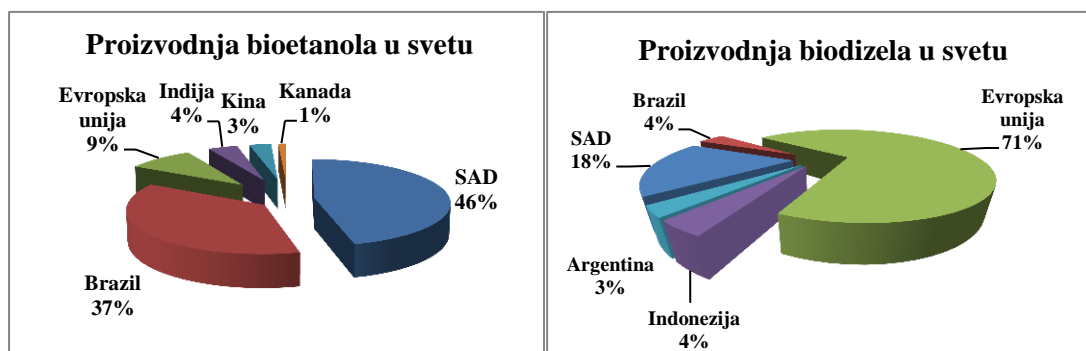
SAD i Brazil su i dalje najveći proizvođači etanola uz proizvodnju koja se nastavila ustaljenom brzinom tokom 2012. godine. Iako je stepen proizvodnje u Africi i dalje relativno nizak, predviđalo se da će porast proizvodnje etanola u ovom delu sveta porasti za čitavih 36%. U Evropi se proizvodnja bioetanola sve više povećava. Tokom 2010. godine ova proizvodnja je dostigla porast od 4%. Očekivano je bilo da će se u Evropi u 2012. godine proizvesti 4,9 milijardi litara etanola, što bi predstavljalo porast od 11% u odnosu na 2011.

Ono što bioetanol stavlja ispred ostalih obnovljivih izvora energije u ovom trenutku je činjenica da se kompletna postojeća naftna infrastruktura može iskoristiti i za distribuciju biogoriva, i da biogorivo može bez problema (ili uz neznatne modifikacije) da sagoreva u benzinskim odnosno dizel motorima (Semenenčenko i sar., 2009).

Uz podršku novih vladinih programa u Americi, Aziji i Evropi, ukupni globalni zahtevi za biogorivima mogli bi premašiti 125 milijardi litara do 2020. godine (Demirbas, 2007).

Na slici 1.3. prikazana je raspodela proizvodnje bioetanola i biodizela u svetu u trenutku kada je ukupna proizvodnja bioetanola iznosila 53,37 milijardi a biodizela 9,46 milijardi litara (2008. godine). Podaci prikazani na slici pokazuju da su najveći

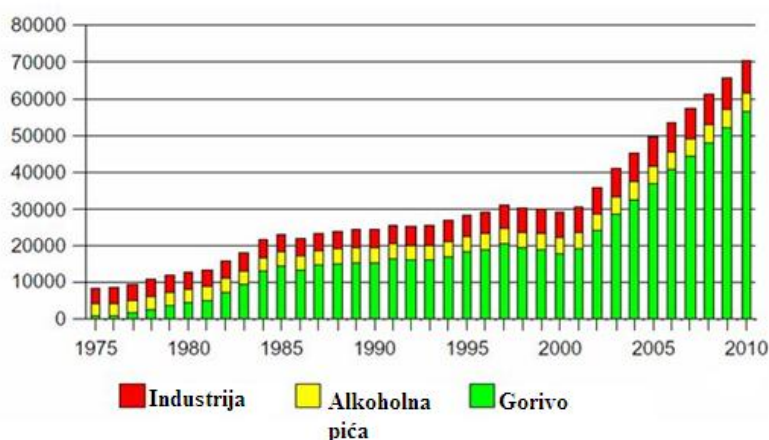
proizvođači bioetanola SAD i Brazil, dok se najviše biodizela proizvodi u Evropskoj uniji.



Slika 1.3. Raspodela proizvodnje bioetanola i bioedizela u svetu (Bayer i sar., 2009)

Osnovna namena etanola može se svrstati u tri oblasti: 1) etanol za primenu u industriji kao sirovina ili rastvarač, 2) etanol za proizvodnju alkoholnih pića, i 3) etanol kao gorivo (slika 1.4).

Svetska proizvodnja etanola (u milionima litara)



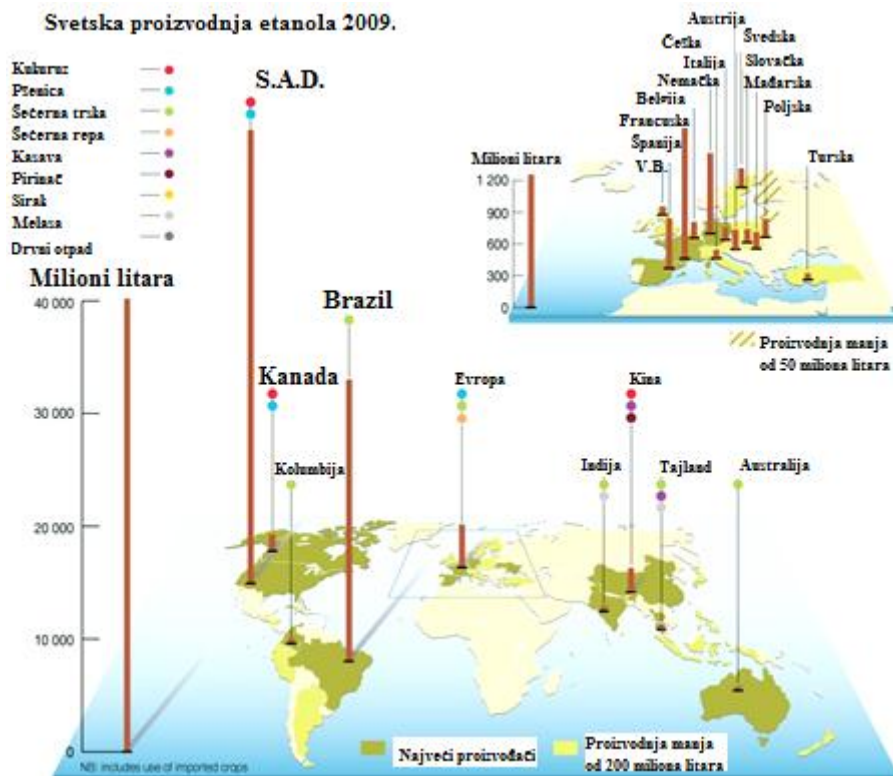
Slika 1.4. Svetska proizvodnja etanola za različite namene u periodu od 1975-2010. godine (Agriculture corner, 2010).

Globalni centar za biogoriva (Global Biofuels Center - GBC) je rangirao 25 država najvećih proizvođača bioetanola prema kapacitetu za proizvodnju ovog goriva (tabela 1.3). Rangiranje je zasnovano na podacima o operativnim kapacitetima sa kraja 2010. godine (GBC, 2012).

Tabela 1.3. Proizvodni kapaciteti 25 zemalja najvećih proizvođača bioetanola

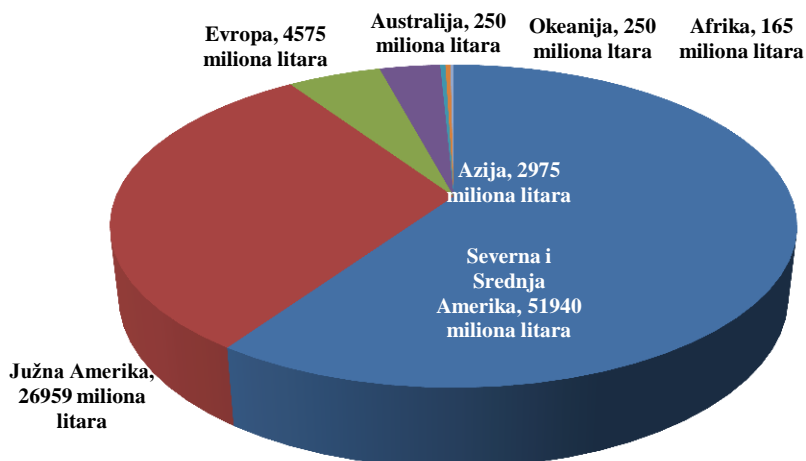
Rang	Država	Milioni litara
1.	SAD	51415,97
2.	Brazil	26887,52
3.	Kina	2699,48
4.	Francuska	1821,03
5.	Kanada	1494,50
6.	Indija	1420,92
7.	Poljska	1079,00
8.	Nemačka	916,97
9.	Tajland	868,50
10.	Jamajka	832,70
11.	Trinidad i Tobago	757,00
12.	Indonezija	683,38
13.	Španija	546,00
14.	Austrija	485,00
15.	Belgija	485,00
16.	Holandija	480,00
17.	Velika Britanija	470,00
18.	Devičanska ostrva (SAD)	387,50
19.	Kolumbija	352,00
20.	Vijetnam	318,11
21.	Australija	292,70
22.	Češka	280,00
23.	El Salvador	247,10
24.	Paragvaj	237,25
25.	Argentina	237,20
	Ukupno	95694,83

Na slici 1.5. prikazana je proizvodnja bioetanola u svetu i pojedinim zemljama Evrope tokom 2009. godine, kao i sirovine od kojih se ovo gorivo najviše proizvodi.



Slika 1.5. Proizvodnja i sirovine za proizvodnju bioetanola u svetu i pojedinim zemljama Evrope tokom 2009. godine (GRID-Arendal, 2012)

Tokom 2010. godine, najviše bioetanola je proizvedeno u Severnoj i Srednjoj Americi, zatim slede Južna Amerika i Evropa (slika 1.6).



Slika 1.6. Svetska proizvodnja bioetanola tokom 2010. godine, po kontinentima (RFA, 2011)

Procenjuje se da će do 2020. godine globalna proizvodnja biogoriva dostići 1900 miliona barela, uz godišnji porast od 10% u prognoziranom periodu od 2015 – 2020. godine. Prognozirani obim proizvodnje bi predstavljao 6% od predviđene svetske proizvodnje tečnog goriva u 2020. godini, što je oko polovina trenutne proizvodnje nafte u Saudijskoj Arabiji i polovina uvoza u SAD (Market Research, 2011).

Nacionalno udruženje uzgajivača kukuruza (National Corn Growers Association - NCGA) u SAD, objavilo je da će u toku 2011. godine, proizvodnja bioetanola umanjiti emisiju gasova staklene bašte za 105 miliona tona, na svetskom nivou što je ekvivalentno smanjenju za više od 287.000 tona dnevno. Svetska proizvodnja etanola trenutno zamenjuje potrebu za više od milion barela sirove nafte dnevno, što bi u protivnom stvaralo svakodnevnu emisiju 545.000 tona gasova staklene bašte.

Tokom 2010. godine, proizvodnja bioetanola je premašila 87 miliona tona, i procenjuje se da je umanjila emisiju gasova staklene bašte za 101 milion tona, redukujući time zagađenje za više od 276.000 tona dnevno. Ukupna redukcija emisije štetnih gasova može se uporediti sa ekvivalentom od 18,7 miliona automobila koji bi prestali da se voze. U saradnji sa F.O. Lichtom, Svetsko udruženje za obnovljiva goriva (GRFA), predvidelo je da je svetska proizvodnja bioetanola u toku 2012. godine trebalo da poraste za više od 3% i da iznosi 88,7 miliona tona. Ovaj porast u proizvodnji trebalo je da rezultira smanjenjem emisije gasova staklene bašte za 9% .

SAD, Brazil i nekoliko članica Evropske unije imaju najznačajnije programe za podsticanje proizvodnje biogoriva u svetu. Uz podršku novih vladinih programa u Americi, Aziji i Evropi, ukupni globalni zahtevi za biogorivima mogli bi premašiti 125 milijardi litara do 2020. godine (Demirbas, 2007).

1.4. Proizvodnja energije u Srbiji

Biomasa je najznačajniji obnovljivi izvor energije u Srbiji. Njeno energetske korišćenje je dozvoljeno u skladu sa propisima koji uređuju zaštitu životne sredine.

Kao zemlja sa velikim poljoprivrednim zemljištem i površinama pod šumom, Srbija ima veliki potencijal za proizvodnju biomase. Biomasa predstavlja 63% ukupnih obnovljivih izvora energije (OIE). Šume pokrivaju oko 30% teritorije, a oko 55% teritorije je obradivo zemljište. Pored ostataka iz ratarstva za proizvodnju hrane, postoje velike mogućnosti za namensko uzgajanje biomase koje neće konkurisati proizvodnji hrane (Akcioni plan za biomasu, 2010). U tabeli 1.4. su prikazani raspoloživi izvori biomase u Srbiji.

Tabela 1.4. Energetski potencijal biomase (Akcioni plan za biomasu, 2010)

Izvor biomase		Potencijal, t
Drvena biomasa		1.527.678
Drvo za loženje		1.150.000
Šumski otpaci		163.760
Ostaci iz prerade drveta		179.563
Drvo od drveća izvan šuma		34.355
Poljoprivredna biomasa		1.670.240
Ostaci od poljoprivrednih kultura		1.023.000
Ostaci od gajenja voća, vinogradarstva i prerade voća		605.000
Tečno stajsko đubrivo (za proizvodnju biogasa)		42.240
Biogoriva za saobraćaj		191.305
Ukupno biomasa	Bez goriva za saobraćaj	3.197.918
	Sa gorivom za saobraćaj	3.389.223

Ratifikacijom Ugovora o osnivanju energetske zajednice (CEC, 2006), Srbija je, između ostalog, prihvatila obavezu primene direktive 2001/77/EC o promovisanju proizvodnje električne energije iz obnovljivih izvora energije i direktive 2003/30/EC o promovisanju korišćenja biogoriva i drugih goriva iz OIE u sektoru saobraćaja, kako bi se obezbedilo pojavljivanje određene količine biogoriva na tržištu – 5,75% od ukupne količine goriva koje se koristi u saobraćaju do kraja 2010. godine. Ova direktiva je u skladu sa Kjoto sporazumom potpisanim 1997. godine sa ciljem da se smanji emisija gasova koji doprinose efektu staklene bašte, čiji je i Srbija potpisnik. Međutim, 2009.

godine Evropska komisija je donela novu Direktivu 2009/28/EC, kojom je utvrđeno promovisanje korišćenja energije iz obnovljivih izvora. Ova Direktiva menja i, shodno tome, ukida Direktive 2001/77/EC i 2003/30/EC, a utvrđuje zajednički okvir za promovisanje energije iz obnovljivih izvora. U njoj su postavljeni obavezani nacionalni ciljevi za sveukupni udeo energije iz obnovljivih izvora u finalnoj bruto potrošnji energije i za udeo obnovljivih izvora u saobraćaju: najmanje 20% učešća energije iz obnovljivih izvora u finalnoj bruto potrošnji energije u Zajednici i 10% učešća energije iz obnovljivih izvora u potrošnji energije za saobraćaj svake Zemlje članice do 2020. godine. Osim toga, ustanovljeni su kriterijumi održivosti za biogoriva i tečna biogoriva. Srbija je usvojila ovu direktivu i ona je ugrađena u Akcioni plan za biomasu koji je usvojen 2010. godine.

Srbija je do sada donela sledeću pravnu regulativu u oblasti obnovljivih izvora energije: 1. Zakon o energetici; 2. Strategiju razvoja energetike Republike Srbije do 2015. godine; 3. Program ostvarivanja strategije razvoja energetike Srbije od 2007-2012. godine. Da bi se postavljeni ciljevi ostvarili, neophodno je doneti podzakonsku regulativu, koja će omogućiti realizaciju planova u ovoj oblasti i to: Uredbu o definisanju statusa povlašćenih proizvođača i Podsticajne mere za proizvođače koji imaju status povlašćenih proizvođača (Semenčenko i sar., 2009).

Značajan deo srpske privrede je baziran na poljoprivrednoj proizvodnji i prehrambenoj industriji. Vojvodina, sa područjima duž reka Dunav i Sava su glavni izvor poljoprivredne biomase koja se može koristiti u energetske svrhe. Voćarstvo, koje je još jedan važan izvor biomase je razvijeno u južnim, brdskim predelima Srbije gde je prisutna proizvodnja šljiva, jabuka, višanja, bresaka i grožđa.

Ukupan potencijal biomase u Srbiji koja se može koristiti u energetske svrhe iznosi oko 2,4 miliona tona ekvivalentne nafte. Biomasa se može koristiti na mnogo različitih načina, ali prema nadležnom ministarstvu, bez obzira na preuzete obaveze, za Srbiju je najperspektivnije korišćenje biomase za zagrevanje prostora u domaćinstvima i zgradama korišćenjem briketa i peleta od biomase i proizvodnju električne energije - u severnim delovima korišćenjem poljoprivredne biomase, a u južnim delovima korišćenjem šumskih ostataka i otpada. Najveća barijera za veće korišćenje biomase u Srbiji je to što je cena električne energije najniža u poređenju sa drugim alternativnim izvorima energije. Pored toga, ne postoji dovoljno iskustva u korišćenju biomase u energetske svrhe, niti razvijeno tržište za prodaju opreme za korišćenje biomase ili

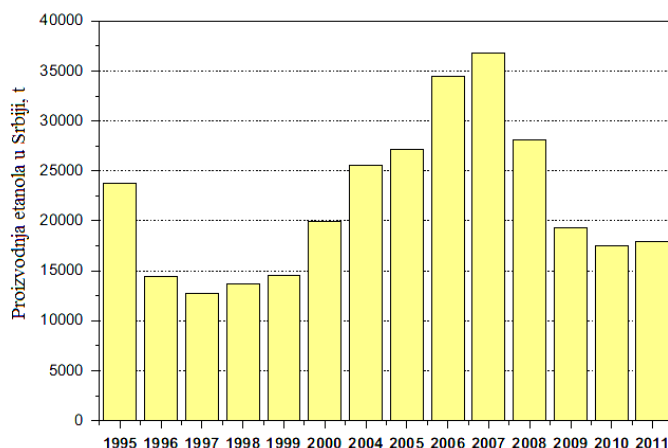
biomase kao goriva. Prevazilaženje ovih barijera će omogućiti veće korišćenje biomase kao najznačajnijeg obnovljivog izvora energije.

1.4.1. Proizvodnja bioetanola u Srbiji

Uprkos značajnom potencijalu za proizvodnju bioetanola, on se u Srbiji ne koristi za proizvodnju bioetanola koji ima energetski značaj. Pri tome svake godine oko 250.000 ha oranica ostane neobrađeno. Danas u Srbiji ne postoji organizovana proizvodnja i potrošnja bioetanola kao motornog goriva, iako je naša zemlja uvoznik značajnog dela svoje potrošnje motornih goriva. Proizvodnja etanola se odvija u 10 postrojenja ukupnog kapaciteta 40 miliona litara apsolutnog etanola. To su uglavnom fabrike koje prerađuju skrob i šećernu repu, kao i pivare i fabrike drugih alkoholnih vrenja. Tokom 2006. godine bila je najavljena izgradnja velike fabrike za proizvodnju bioetanola na ulazu u Zrenjanin, u Industrijskoj zoni Ečka, (strana investicija vredna 380 m€) u kojoj bi se godišnje prerađivalo milion tona pšenice i 500.000 tona kukuruza. Ovaj projekat nije ostvaren.

Trenutno se proizvodnja bioetanola u Srbiji bazira na melasi (50%) i žitaricama (50%) (Mojović i sar., 2007). Nivo proizvodnje koji je trenutno znatno niži nego krajem devedesetih godina dvadesetog veka (slika 1.7) nije dovoljan ni da se zadovolje potrebe industrije alkoholnih pića, medicinskih i farmaceutskih proizvoda u Srbiji. To je jedan od glavnih razloga što u Srbiji još uvek ne postoji organizovana proizvodnja i upotreba bioetanola ili drugih biogoriva kao zamene za naftne derivate.

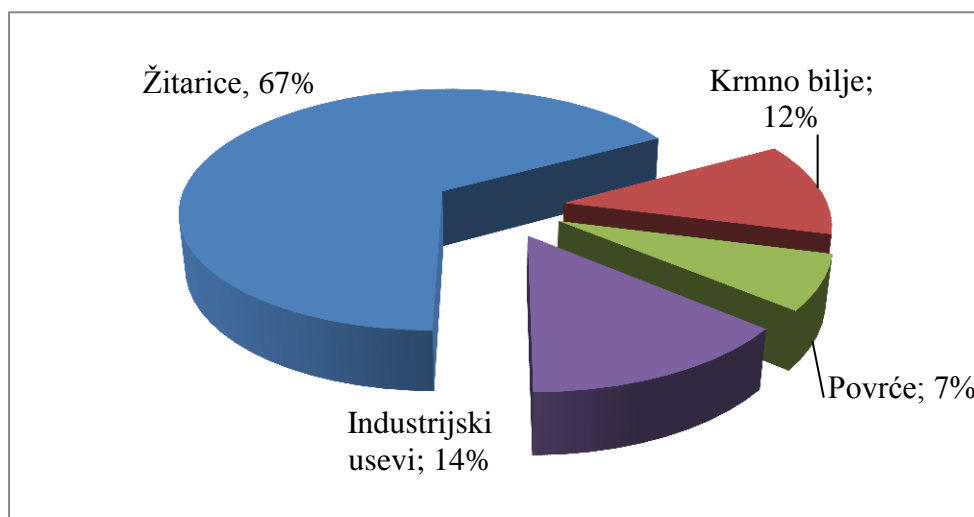
Ranija istraživanja su pokazala da je u Srbiji neophodna izgradnja novih postrojenja za proizvodnju bioetanola kako bi se proizvelo dovoljno bioetanola kao alternativnog goriva u skladu sa direktivom Evropske unije 2003/30/EC. Shodno tome procenjeno je da je bilo potrebno oko 80.000 t bioetanola da bi se u Srbiji zamenilo 5,75% benzina (Mojović i sar., 2007). Prema direktivi Evropske unije 2009/28/EC ovaj iznos bi trebalo skoro da se udvostruči do 2020. godine.



Slika 1.7. Proizvodnja bioetanola u Srbiji u periodu od 1995 do 2011. godine (Mojović i sar., 2012)

Srbija zemlja čija se proizvodnja pretežno zasniva na poljoprivredi. Raspolaze sa oko 5092 miliona ha poljoprivrednog zemljišta od čega je 4218 miliona ha obradivo (što čini 0,56 ha po glavi stanovnika) (Privredna komora Srbije, 2012). Na osnovu površine obradivog zemljišta po glavi stanovnika Srbija se nalazi iznad evropskog proseka. U strukturi stvorene vrednosti poljoprivredne proizvodnje 70% potiče iz biljne proizvodnje, a 30% iz stočarske proizvodnje. Poređenja radi, u EU 70% vrednosti u poljoprivredi je poreklom iz stočarske, a 30% iz biljne proizvodnje. Procenjuje se da poljoprivreda i industrija bazirana na poljoprivredi (prehrambena i industrija hrane za životinje) učestvuju u bruto domaćem proizvodu sa približno 40% (Privredna komora Srbije, 2012).

Na osnovu trenutne poljoprivredne proizvodnje u Srbiji, sirovine na bazi skroba imaju najbolju perspektivu za proizvodnju bioetanola. Danas se na približno 70% obradivog zemljišta seju žitarice (slika 1.8).



Slika 1.8. Zasejana obradiva površina u Srbiji tokom 2010. godine (Mojović i sar., 2012)

Usev koji je trenutno najpogodniji za proizvodnju bioetanola u Srbiji je kukuruz. Objavljen je podatak da je u Srbiji tokom 2009. godine ukupan prinos kukuruza iznosio oko 7 miliona tona, a procenjuje se da domaće potrebe ne premašuju 4-4,5 miliona tona (Nikolić i sar., 2009). To znači da se proizvodi dovoljno kukuruza i za druge namene, odnosno da se značajne količine mogu koristiti i za proizvodnju bioetanola (Nikolić i sar., 2009; Nikolić i sar., 2009.a; Mojović i sar., 2006; Nikolić i sar., 2008). Međutim, trenutno sve veća potražnja kukuruza i pšenice na svetskom tržištu dovodi do povećanja cena ovih sirovina što dodatno otežava pristupačnost ovih sirovina. Iz tih razloga, mogućnosti primene jeftinijih sirovina kao što su oštećeni usevi i tritikale se sve više ispituju (Mojović i sar., 2009; Pejin i sar., 2009; Pejin i sar., 2012). Pored toga, treba razmotriti i mogućnosti proizvodnje bioetanola od lignoceluloznih sirovina u bliskoj budućnosti.

Kada se razmatra potencijalna biomasa za proizvodnju bioetanola, treba posebno staviti akcenat na useve koji se mogu gajiti na marginalnom zemljištu. Procenjuje se da Srbija raspolaže sa oko 100.000 ha zemljišta lošijeg kvaliteta koje nije pogodno za standardne poljoprivredne useve, ali bi se mogla koristiti za gajenje alternativnih sirovina za proizvodnju bioetanola kao što su: sirak, čičoka i tritikale (Baras i sar., 2002). Treba razmotriti i mogućnost primene oštećenih i useva slabijeg kvaliteta (naročito žitarica) koji ne ispunjavaju zahteve za proizvodnju hrane.

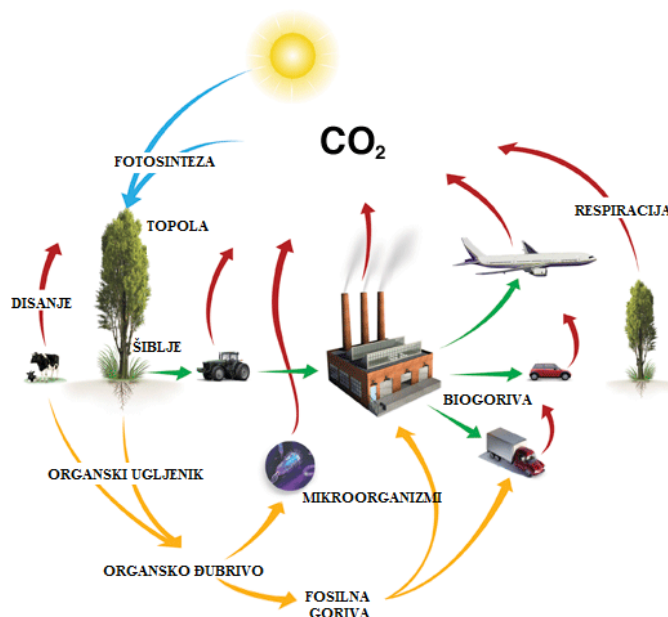
Oko hiljadu istraživača (što je šestina istraživača u istraživačko-razvojnim intenzivnim naukama - prirodno-matematičke, tehničko-tehnološke i biohemijske) je zaposleno u naučno-istraživačkim organizacijama (NIO) u biohemjskom sektoru: 315 u

NIO, 659 u visoko-školskim organizacijama i 25 u istraživačko-razvojnim centrima – (podaci za 2004. godinu). U desetak NIO se obavljaju istraživanja vezana za biogorivo i posebno bioetanol. Formiralo se nekoliko naučno-istraživačkih grupa, posebno u Beogradu i Novom Sadu koje pojedinačno, a ponekad i u saradnji obavljaju istraživanja koja obuhvataju različite aspekte proizvodnje bioetanola: kvalitet i karakteristike osnovne sirovine, enzime, kvasce, delove procesa pripreme i proizvodnje itd (Semenčenko i sar., 2009). U Institutu za kukuruz „Zemun Polje“, na domaćim sirovinama i zahvaljujući bogatstvu različitih hibrida kukuruza, obavljaju se istraživanja sa mogućnostima daljeg doprinosa razvoju procesa dobijanja etanola (Radosavljević i sar., 2009). U okviru projekata tehnološkog razvoja MNTR 2008-2011. sedam projekata je bilo vezano za proizvodnju i korišćenje biomase i bioetanola (2 iz biotehnike, 2 u oblasti saobraćaja, 2 energetske efikasnosti, 1 materijali).

1.5. Ekološki i ekonomski aspekti primene bioetanola

Jedan od glavnih razloga za razvoj industrije biogoriva jeste smanjenje emisije gasova staklene bašte. Četiri glavne grupe izduvnih jedinjenja su ugljovodonici, ugljen-monoksid, oksidi azota i ugljen-dioksid (Freudenberger, 2009.b). Etanol se smatra čistim izvorom energije koji oslobađa znatno niže koncentracije polutanata i gasova staklene bašte iz motornih vozila nego benzin (Liska i sar., 2009). Dobija se od bioobnovljivih biljnih sirovina. Na taj način se ugljen-dioksid oslobođen tokom proizvodnje i sagorevanja apsorbuje u toku fotosinteze za rast budućih biljnih sirovina, što dalje dovodi do sniženja emisije ugljen-dioksida u atmosferu (Rassmusen, 2009). Etanol takođe emituje manje ugljen-monoksida i oksida azota nego benzin. Za razliku od goriva na bazi naftnih derivata, etanol sadrži kiseonik u svojoj molekulskoj strukturi, što dovodi do potpunijeg sagorevanja u automobilima, rezultujući u smanjenoj emisiji ovih zagađivača. Zbog potpunijeg sagorevanja etanola, smeše etanola i benzina doprinose smanjenoj emisiji aromatičnih ugljovodonika (na primer benzena). Sve to doprinosi da se emisija gasova staklene bašte smanji za 48-59% što u celini ima pozitivan uticaj na životnu sredinu (Liska i sar., 2009).

Na slici 1.9. prikazano je kruženje ugljen-dioksida u prirodi.



Slika 1.9. Kruženje ugljen-dioksida u prirodi

Prema izveštaju međunarodnog udruženja naučnika pod nazivom Globalni Projekat Ugljenika (Global Carbon Project), globalna emisija ugljen-dioksida porasla je tokom 2010. godine za rekordnih 5,9%.

Do danas su bioetanol na bazi žitarica i biodizel predstavljali jedina komercijalna obnovljiva goriva prisutna na tržištu. Nažalost, plodno zemljište dostupno za gajenje kukuruza je ograničeno. Kako bi se zadovoljila povećana potražnja za kukuruzom, farmeri bi morali da koriste zemljište predviđeno za druge useve što bi dovelo do promena na tržištu poljoprivrednih proizvoda. Konkurencija između hrane i biogoriva će se, ako ne već sada, zasigurno pojaviti u budućnosti. Da bi se ovo predupredilo, u svetu se ulažu velike investicije u programe selekcije kako bi se povećao prinos bioetanola i razvili novi hibridi kukuruza pogodni za proizvodnju bioetanola.

Searchinger i saradnici (2008) su otvorili polemiku koja se tiče indirektno promene korišćenja zemljišta u vezi sa proizvodnjom biogoriva, koja sugeriše da bi upotreba žita kao što je kukuruz u SAD u budućnosti dovela do potrebe obrađivanja zemljišta negde drugde u svetu a time i do izmeštanja gajenja useva namenjenih proizvodnji biogoriva. Ukoliko bi se za te svrhe koristilo zemljište koje je trenutno pokriveno šumama ili pašnjacima koji vezuju ugljen-dioksid iz atmosfere, došlo bi do

oslobađanja veće količine ugljenika u atmosferu što bi negiralo potencijal smanjenja emisije gasova staklene bašte koji se postiže zamenom fosilnih goriva biogorivima.

Sa ekonomske tačke gledišta veoma važan sporedni proizvod industrije bioetanola od žita je suva džibra sa rastvorenim materijama (Smith i sar., 2006; Cotrill i sar., 2007). Kao odgovor na Searchingerovu analizu, Croezen i Brouwer (2008) su došli do zaključka da bi džibra od pšenice proizvedene u Evropi mogla delimično da zameni pšeničnu, kukuruznu i sojinu prekrupu u smešama za ishranu životinja koja se uvozi iz Južne Amerike. Tako bi se korišćenjem džibre smanjila potreba za krčenjem šuma i pašnjaka u Južnoj Americi, što bi svakako pozitivno uticalo na očuvanje životne sredine.

Analiza uticaja biogoriva na tržište (Hertel i sar., 2008; Taheripour i sar., 2008; Tokgoz i sar., 2007; Tyner, 2007; Tyner i Taheripour 2007) ukazala je na značajnu vezu između ponude i potražnje u kojoj takmičarsku ulogu sa proizvođačima biogoriva ima ishrana domaćih životinja koja zavisi kako od žita koja se koriste za proizvodnju biogoriva, tako i od nusprodukata ove industrije. Korišćenje poljoprivrenih dobara u proizvodnji hraniva za životinje, hrane za ljude i goriva stvara kompleksne relacije na tržištu koje se moraju dobro razumeti da bi se precizno izbalansirao odnos ovih proizvoda na međunarodnom tržištu kao i njihove tržišne cene.

Ekspanziji industrije proizvodnje etanola kao goriva može se pripisati pozitivan uticaj na životnu sredinu i ekonomiju. U toku 2010. godine industrija bioetanole u Sjedinjenim Državama je obezbedila preko 400.000 radnih mesta, u SAD, povećala bruto prihod domaćeg proizvoda, i obezbedila dodatnih 36000 \$ prihoda američkim domaćinstvima (Urbanchuk, 2011). Pored toga, ova industrija je povećala mogućnosti za poljoprivredne proizvođače a samim tim i unapredila razvoj sela. Etanolom je zamenjeno 10% potreba za benzinom u SAD i smanjena zavisnost od uvozne nafte.

Bioetanol proizveden od kukuruza smatra se glavnim krivcem za porast cena hrane tokom poslednjih nekoliko godina. Smatra se da su povećani zahtevi za žitaricama koje je izazvala proizvodnja bioetanola doveli do porasta cena mesa, jaja, mlečnih i drugih proizvoda. Detaljna analiza koju je sproveo Hofstand (2008) pokazala je, međutim, da je nekoliko drugih razloga osim goriva od žitarica uticalo na iznenadni porast cena hrane: sve manje zalihe žitarica, uticaja vremenskih nepogoda na useve, porast populacije zemalja u razvoju, zabrane izvoza, visoke cene naftnih derivata i slabljenje dolara.

Rast cena žitarica započeo je znatno pre početka ekspanzije biogoriva. Smatralo se da je nagli porast cena nafte najviše doprineo porastu cena hrane. Prehrambena industrija u mnogome zavisi od benzina odnosno nafte, kako u procesima proizvodnje tako i u cilju transporta robe. Takođe, naftne derivate koriste i mašine za oranje, setvu, oprašivanje (polinaciju), žetvu i transport useva pa tako, direktno gorivo utiče na cene žitarica a indirektno na cene mesa, mlečnih proizvoda i jaja. Ono što je sigurno, međutim, jeste činjenica da će zahtevi za biogorivima nastaviti da rastu.

Istraživači kao Pimentel (2001) i Searchinger i sar., (2008) kritikovali su bioetanol na bazi žitarica kao energetski neefikasan i time doprineli negativnom publicitetu ovog biogoriva. Pimentel (2001) je tvrdio da je potrebno 70% više energije da bi se proizveo bioetanol od energije kojom ovo biogorivo zapravo raspolaže. Njegova studija objavljena 2001. godine inicirala je brojne članke u kojima je etanol nazvan "zločinom protiv čovečanstva". Pimentelov proračun je, međutim, bio zasnovan na zastarelim rezultatima. Jedna novija studija je pokazala da se od bioetanola dobija 130% više energije nego što je potrebno da se on proizvede (Shapouri i sar., 2010). Uz nova poboljšanja u proizvodnji bioetanola, kao što je tehnologija hladne fermentacije, energetsko opterećenje je još više smanjeno zato što ne zahteva zagrevanje suspenzije kukuruza i mešanje visokoviskoznog želatinizovanog skroba.

Iako se bioetanol decenijama proizvodi iz skrobnih i šećernih sirovina, korišćenje obradivih površina i useva, namenjenih prvenstveno ishrani, za proizvodnju ovog goriva prouzrokovalo je da se danas intenzivno razvijaju tehnologije za dobijanje bioetanola iz lignoceluloznih izvora biomase kao što su šumski, poljoprivredni i komunalni otpad. Upotreba lignocelulozne biomase za proizvodnju biogoriva biće neizbežna ako se tečna fosilna goriva budu morala zameniti alternativnim i obnovljivim izvorima. Primena novorazvijenih enzimskih preparata za hidrolizu celuloze, sinteza sojeva tolerantnih na inhibitore koji fermentišu pentozu, u kombinaciji sa optimizovanom integracijom procesa, obećavaju značajan napredak.

Mnogi istraživački projekti poslednjih godina su usmereni ka razvoju koncepta obnovljivih izvora energije, održivom razvoju, „zelenoj energiji“ i ekološki prihvatljivim procesima proizvodnje. Da bi masovna proizvodnja bioetanola bila moguća, neophodno je da ovaj proces bude ekonomski isplativ i da u celini ne utiče negativno na životnu sredinu.

Kako bi proces proizvodnje biogoriva bio ekonomski isplativ, cena različitih vrsta ovih goriva mora biti konkurentna međusobno, ali i sa fosilnim gorivima kao što su dizel i benzin. Ova konkurentnost omogućava dostupnost biogoriva na tržištu i mogućnost da potrošači pređu sa fosilnog na biogorivo.

S obzirom da je do danas cena bioetanola znatno viša od cene fosilnog benzina, vlade nekih država uvode posebne povlastice kako bi podstakle proizvodnju i potrošnju bioetanola u sektoru saobraćaja. Razlikuju se tri glavna pristupa u implementaciji regulativa i politika za biogoriva: 1) politika zasnovana na uvođenju taksa, 2) politika zasnovana na uvođenju subvencija u poljoprivredi i 3) uvođenje zakonske regulative vezane za gorivo (Smith i sar., 2008). Na razvoj i promovisanje biogoriva danas mnogo više utiče sektor poljoprivrede nego energetski sektor. Štaviše, većina programa koja promovišu korišćenje biogoriva zavisi od subvencija i vladinih programa, koji mogu dovesti do poremećaja cena na tržištu i predstavljati veliko opterećenje za državni budžet. Ako bi se cene nafte održale na ovako visokom nivou, i uz postojani razvoj sve efikasnijih i jeftinijih tehnologija, biogoriva bi u bližoj budućnosti mogla postati ekonomski isplativa alternativa u mnogim državama (DeFraiture i sar., 2008).

Cena sirovina i njena promenljivost znatno utiču na cenu bioetanola (Yoosin i sar., 2007). Sirovine predstavljaju 60–75% ukupnih troškova proizvodnje bioetanola (Balat i Balat, 2009). U opštem slučaju, proizvodnja bioetanola iz šećernih sirovina (kao što je šećerna trska), znatno je jeftinija nego proizvodnja iz skrobnih sirovina. Iako je prinos etanola iz kukuruza viši nego iz šećerne repe, zbog manjeg godišnjeg prinosa po hektaru kukuruza, neophodno je zasejavati veće obradive površine, a to se negativno odražava na proizvodnju hrane.

2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA

Sirovine za proizvodnju bioetanola mogu se podeliti u tri osnovne grupe: 1) šećerne (šećerna repa, šećerna trska, sirak, voće itd), 2) skrobne (kukuruz, pšenica, pirinač, krompir, kasava, slatki krompir, ječam itd), 3) lignocelulozne (drvo, poljoprivredni viškovi, komunalni otpad itd.) i 4) sporedni proizvodi različitih tehnoloških procesa.

Za proizvodnju bioetanola se mogu koristiti sve sirovine koje sadrže šećere ili polisaharide koji se mogu razgraditi do šećera koje kvasac može da fermentiše. U šećere koje kvasac može da previre spadaju: glukoza, fruktoza, saharoza i maltoza, a primenom specijalnih sojeva kvasca i galaktoza i laktoza. Polisaharidi koji se mogu razgraditi do ovih fermentabilnih šećera (hemijski ili enzimski) su: dekstrini, skrob, inulin, hemiceluloza i celuloza (Roher, 2001; Wyman, 1996)

Šećerne sirovine se mogu, pomoću kvasca, razgraditi direktno metaboličkim putem, te ovakvi supstrati ne zahtevaju skupu pripremu. Sirovine koje sadrže skrob i lignocelulozni kompleks su jeftinije od sirovina koje sadrže šećer, ali je prevođenje ovih sirovina do oblika koji je dostupan kvascima skupo i predstavlja nedostatak ovih supstrata (Mojović i sar., 2007; Nikolić i sar., 2009, 2009.a).

Najvažnije poljoprivredne kulture koje se koriste kao sirovine za proizvodnju etanola su navedene u tabeli 2.1. Tu su predstavljeni i prosečni prinosi u poljoprivredi, specifična iskorišćenja etanola računato na jedinicu poljoprivredne površine. Prinosi po jedinici površine znatno variraju zavisno od klime, osobina zemljišta i primenjenih agrotehničkih mera, pa je u tabeli 2.1. ovaj parametar dat u određenom opsegu.

Tabela 2.1. Prosečni prinosi i iskorišćenja na etanol važnijih poljoprivrednih sirovina (Mojović i sar., 2007)

Sirovina	Prinos, t·ha ⁻¹	Specifično iskorišćenje etanola na sirovinu, hl·t ⁻¹	Iskorišćenje etanola na površinu, hl·ha ⁻¹
Šećerna trska (Brazil)	100	~0,68	~50
Šećerna repa	66-78	~0,80	50-60
Sirak šećerac	~25	~0,68	~17,0
Kukuruz (SAD)	7-8	~3,50	~2,0
Pšenica	2-5	~3,70	7,4-18,5
Sirak	1-6	~3,40	3,2-20,4
Krompir	17-20	~1,00	17-20
Sladak krompir (batata)	10-15	~1,30	13,0-19,5
Manioka	12-25	~1,70	20,4-42,5
Jerusalimska artičoka (topinambur)	20-50	~0,77	15,4-30,8

Vodeći proizvođači etanola su Brazil i SAD, koji zajedno čine 80% ukupne svetske proizvodnje (Balat i Balat, 2009). Najveći procenat etanola (90%) proizvodi se fermentacijom glukoze iz kukuruznog skroba (SAD) i saharoze iz šećerne trske (Brazil). Trenutno proizvodnja bioetanola kao pogonskog goriva gotovo u potpunosti zavisi od skroba i šećera iz postojećih poljoprivrednih useva. Glavni nedostatak korišćenja skrobnih i šećernih sirovina jeste njihova cena i to što im je primarna namena za ishranu. U Srbiji, jedna od najpogodnijih i najrasprostranjenijih poljoprivrednih sirovina za industrijsku proizvodnju bioetanola je kukuruz (Nikolić i sar., 2010).

2.1. Šećerne sirovine

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L) (slika 2.1, levo) je veoma rasprostranjena biljka koja se lako prilagođava podneblju i klimatskim uslovima. U tehnološkom pogledu, najznačajniji je koren šećerne repe jer sadrži najveći procenat saharoze (12-25%). Korišćenje šećerne repe za proizvodnju bioetanola zavisi od njene trenutne cene i podobnosti za rast na određenom podneblju i klimatskim uslovima. Postoje genetički modifikovane sorte koje mogu dati bolje prinose fermentabilnih šećera po jedinici površine i mogu se duže skladištiti. Međutim, cena etanola proizvedenog iz šećerne repe još uvek nije konkurentna ceni bioetanola proizvedenog iz šećerne trske ili kukuruza.



Slika 2.1. Šećerne sirovine za proizvodnju bioetanola: šećerna repa (levo), šećerna trska (u sredini) i topinambur (desno)

Šećerna trska (*Saccharum officinarum*) (slika 2.1, u sredini) najbolje uspeva u tropskim i subtropskim krajevima, a najviše se gaji u Brazilu, Indiji, Južnoafričkoj Republici i Kubi. Šećerna trska je najznačajnija sirovina za proizvodnju bioetanola u Brazilu. Osnovni sastojak šećerne trske je saharoza (70-91%), a sadrži i glukozu (2-4%) i fruktozu (2-4%) (Mojović i sar., 2007). Nedostatak ove biljke je što se ne može skladištiti posle žetve, pa se ne može uvoziti iz tropskih zemalja.

Topinambur ili Jerusalimska artičoka (*Helianthus tuberosus*) (slika 2.1, desno) je krtolasta biljka poreklom iz Južne Amerike. Ne zahteva kvalitetno zemljište, otporan je na štetočine i biljne bolesti kao i na niske temperature. Krtola ove biljke sadrži veliki procenat ugljenih hidrata, uglavnom inulina. Inulin je polisaharid koji se sastoji od ostataka fruktoze i za razliku od skroba lakše se razgrađuje do šećera koje kvasac može da fermentiše. Iako su ispitivanja vršena u Vojvodini na nekoliko lokaliteta, vezano za korišćenje topinambura kao sirovine za bioetanol, dala veoma dobre rezultate što se tiče prinosa u odnosu na druge skrobne i šećerne sirovine, ova biljka se neće gajiti na plodnom zemljištu u našoj zemlji zbog neophodnosti gajenja osnovnih ratarskih kultura.

2.2. Skrobne sirovine

Krtolaste sirovine

Krompir (*Solanum tuberosum*) (slika 2.2, levo) je krtolasta biljka koja se koristi za proizvodnju etanola najviše u Nemačkoj i Istočnoj Evropi. Za proizvodnju etanola prvenstveno je zaslužan veliki sadržaj skroba (12-21%) u krompiru, kao i prisustvo nekih drugih šećera (saharoza, glukozu, fruktozu) u manjem procentu. Upotreba krompira kao sirovine za proizvodnju bioetanola, opravdana je jedino u slučaju postojanja značajnih količina otpadnog materijala pri preradi krompira, kao i u oblastima sa velikim tržišnim viškovima.

Batata ili slatki krompir (*Ipomoea batatas*) (slika 2.2, u sredini) iz familije krompira, je krtolasta biljka poreklom iz Južne Amerike, koja u sebi sadrži skrob. Uspeva u toplim krajevima, čak i u zemljištu slabijeg kvaliteta, a može se skladištiti i do 10 meseci, pod optimalnim uslovima. Koristi se za proizvodnju šećera i industrijskog alkohola.

Kasava (tapioka, juka korenje, gari, manioka) (*Manihot esculenta*) (slika 2.2, desno) je tropska biljka koja formira korenje koje sadrži skrob. Najviše se gaji u

Brazilu, Indoneziji i Zairu. Korenje kasave sadrži 20-35% skroba. Ova biljka je pogodna za proizvodnju bioetanola zbog potencijalno visokog prinosa alkohola po hektaru, ne zahteva plodno zemljište, otporna je na sušu i bolesti, lako se skladišti. Za fermentaciju zahteva pH vrednosti bliske neutralnoj tako da fermentacionoj kaši nije potrebno dodavati kiselinu za podešavanje pH niti nutrijente za rast kvasca, čime se smanjuje problem korozije.



Slika 2.2. Skrobne sirovine za proizvodnju bioetanola: krompir (levo), batata (u sredini) i kasava (desno)

Žitarice

Iako se žitarice uglavnom koriste za ishranu ljudi i životinja, visoki sadržaja skroba ih čini veoma pogodnim sirovinama za proizvodnju biogoriva i drugih bioproizvoda. Bioetanol je jedino biogorivo koje se iz ovih sirovina komercijalno proizvodi. Sadržaj skroba i teorijski prinosi etanola iz zrna pojedinih žitarica prikazani su u tabeli 2.2.

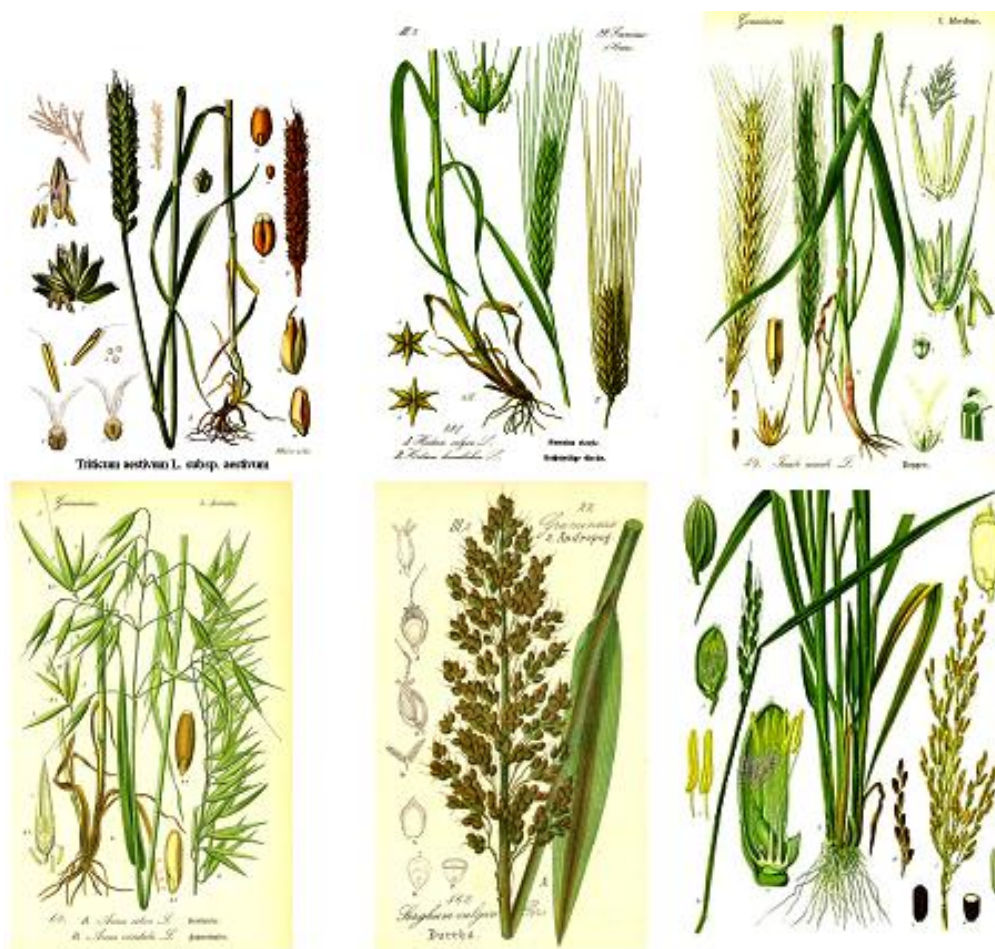
Tabela 2.2. Sadržaj skroba i teorijski prinosi etanola iz najznačajnijih žitarica (preračunato na suhu materiju) (Drapcho i sar., 2008; Juliano, 1993)

Sirovina	Skrob, %	Teorijski prinos etanola	
		l·kg ⁻¹	l·t ⁻¹
Kukuruz	72 (65 - 76)	0,52	473
Pšenica	77 (66 - 82)	0,55	500
Ječam	57 (55 - 74)	0,41	371
Sirak	72 (68 - 80)	0,52	473
Ovas	58 (45 - 69)	0,42	382
Pirinač	79 (74 - 85)	0,57	519

Pšenica (*Triticum*) (slika 2.3, gore levo) sadrži oko 60% skroba i 11,7% sirovih proteina (Mojović i sar., 2007). Udeo proteina je veći nego kod kukuruza. Proteini pšenice su kvalitetniji za ishranu ljudi i životinja jer sadrže esencijalnu amino kiselinu lizin. Međutim, s obzirom da su proteini pšenice nerastvorni u vodi, oni mogu izazvati probleme prilikom proizvodnje bioetanol. Ukoliko pšenica sadrži preko 13% sirovih proteina javljaju se problemi u vidu stvaranja pene tokom fermentacije. Zbog toga su za proizvodnju bioetanol pogodne samo one sorte koje sadrže nizak procenat proteina, a samim tim i veći procenat skroba. Pšenični skrob se trenutno koristi za proizvodnju etanol u samo dva postrojenja u SAD, dok se u Kanadi 15% bioetanol proizvodi fermentacijom ove sirovine. U Australiji i Evropi, naročito u Nemačkoj, pšenica predstavlja glavnu sirovinu na kojoj se bazira razvoj proizvodnje bioetanol iz skrobnih sirovina.

Istraživanja su pokazala da se neke od domaćih sorti pšenice koje nisu pogodne za pekarsku industriju mogu koristiti za dobijanje etanol (Mojović i sar., 2007). Sporedni proizvodi industrije bioetanol su suva džibra sa rastvorenim materijama i gluten koji se sastoji od 80-90% proteina pšenice. Gluten je značajan aditiv u pekarskoj industriji i industriji mesa i ribljih proizvoda (Drapcho i sar., 2008). Džibra od pšenice se sve više primenjuje u ishrani životinja u Kanadi, Evropi i drugim delovima sveta.

Pšenična džibra ima veći sadržaj proteina (38%) i pepela (5,3%), manje masti (4,6%) i slične udele ADF-a (*Acid Detergent Fibre* – vlakna nerastvorljiva u kiselom deterdžentu, engl.) i NDF-a (*Neutral Detergent Fibre* – vlakna nerastvorljiva u neutralnom deterdžentu, engl.) kao kukuruzna džibra. Niži udeo masti ukazuje da je energetska vrednost pšenične džibre nešto niža nego kukuruzne. Sadržaj lizina, metionina i triptofana su viši u pšeničnoj nego u kukuruznoj džibri (US Grains Council, 2012).



Slika 2.3. Žitarice sirovine za proizvodnju bioetanola: pšenica, ječam, raž (gornji red), ovas, sirak i pirinač (donji red)

Ječam (*Hordeum vulgare*) (slika 2.3, druga gore) **i raž** (*Secale cereale*) (slika 2.3, gore desno) su sirovine koje daju niži prinos po zasejanoj površini i najčešće se koriste za proizvodnju alkoholnih pića, a njihova upotreba za proizvodnju bioetanola je opravdana ako se koristi oštećeno zrno. Ječam ima znatno manji udeo skroba u zrnu od kukuruza (tabela 2.2) zbog čega je i prinos etanola po jedinici mase znatno niži. Ljuska ječma je tvrda i može oštetiti opremu za mlevenje i preradu zrna. Ječam sadrži izvesnu količinu β -glukana, linearnog nerazgranatog polisaharida β -D-glukoze nalik celulozi, ali sa β -1,3 vezama na svake 3 ili 4 β -1,4 veze. Beta-glukan je rastvorljiv u vrućoj vodi i izaziva takav porast viskoziteta fermentacione smeše da je pri 30% suve materije (tipični uslovi industrijske fermentacije) praktično nemoguće obezbediti adekvatno mešanje. Prisustvo β -glukana u suvoj džibri ne pogoduje ishrani nepreživara kao što su živina i svinje. Neki proizvođači enzima kao što su Novozymes i Danisco razvili su komercijalne preparate za smanjenje viskoziteta smeše (Viscozymes (Novozymes) i Optimash (Danisco)). Proteini ječma sadrže lizin pa su zbog toga značajan sporedni

proizvod. Beta–glukan bi mogao biti drugi potencijalno značajan i isplativ proizvod zahvaljujući mnogim pozitivnim dejstvima koje ima na zdravlje kao što su povećanje imuniteta i smanjenje nivoa LDL holesterola (Drapcho i sar., 2008).

Ovas (*Avena sativa*) (slika 2.3, dole levo) se do sada nije primenjivao u komercijalnoj proizvodnji etanola iz više razloga. Sadrži relativno nizak procenat skroba (tabela 2.2) a masa ljuske zrna čini čak 34% od ukupne mase, čime se umanjuje količina skroba u fermentoru. Zrno takođe sadrži β –glukan i pentozane koji nakon rastvaranja u vrućoj vodi izazivaju značajan porast viskoziteta fermentacione smeše. Komercijalna proizvodnja etanola iz zrna ovasa mogla bi postati moguća ako bi se proces modifikovao (Drapcho i sar., 2008).

Tritikale (*Triticosecale*) je hibrid pšenice i raži. Za razliku od ostalih žitarica, može da razgradi sopstveni skrob, jer ima relativno visoku sopstvenu autoamilolitičku aktivnost. Podnosi niske temperature, uspeva na nekvalitetnom zemljištu i otporan je na biljne bolesti. Proces proizvodnje etanola je jednostavniji od onih u kojima se koriste pšenica i raž. Pokazalo se da se fermentacija pomoću kvasca *Saccharomyces diastaticus* može izvoditi bez prethodne saharifikacije zahvaljujući autoamilolitičkom enzimskom sistemu.

Sirak (*Sorghum*) (slika 2.3, drugi dole) obuhvata veći broj kulturnih i divljih sorti biljaka, uspeva na svim kontinentima. Sadrži šećer i skrob. Procenat skroba je sličan udelu skroba kukuruznog zrna (tabela 2.2). Pogodan za proizvodnju bioetanola zbog svoje prilagodljivosti uslovima sredine i malim zahtevima za đubrenjem i naprednom agrotehnikom. Veoma je otporan na sušu i toplotu zato što poseduje voštani sloj omotača na lišću i stabljikama koji sprečava isparavanje vode iz biljke. U Svetu je tokom 2006. godine proizvedeno 41,2 miliona tona bioetanola od sirka, najviše u SAD, Nigeriji i Indiji (Drapcho i sar., 2008). Prinosi etanola od kukuruza i sirka su jednaki. Sastavi džibre su takođe slični. U SAD se džibra sirka kao i smeša džibre sirka i kukuruza koriste u ishrani nekih domaćih životinja. Džibra dobijena od sirka ima nešto viši procenat proteina, znatno veći udeo ADF-a i pepela i manji udeo masti i lizina u poređenju sa kukuruznom džibrom (U.S. Grains Council, 2012).

Pirinač (*Oryza sativa*) (slika 2.3, dole desno) je prema ukupnoj svetskoj proizvodnji treća po redu najznačajnija žitarica posle pšenice i kukuruza. Pirinač ima nekoliko svojstava koja ga čine pogodnom sirovinom za proizvodnju bioetanola, a njegovo zrno ima visok sadržaj skroba (tabela 2.2). Ljuska i mekinje se mogu lako razdvojiti i ukloniti iz zrna kako bi se povećala koncentracija skroba u fermentoru. Iako

se pirinač može gajiti na različitim terenima, čak i na veoma strmim brdima, on zahteva velike količine vode za navodnjavanje, a setva je veoma težak i naporan proces. Međutim, u oblastima u kojima se pirinač najviše gaji, kao što je Azija, sav pirinač se iskoristi za ishranu. U razvijenijim delovima sveta, kao što su SAD, za proizvodnju etanola se mogu koristiti oštećena zrna koja se uglavnom bacaju ili koriste za ishranu životinja. Prema jednom izveštaju, procenjeno je da bi se od otpadnog pirinča u Severnoj Americi moglo napraviti 170 miliona litara bioetanola godišnje (Drapcho i sar., 2008).

2.3. Lignocelulozne sirovine

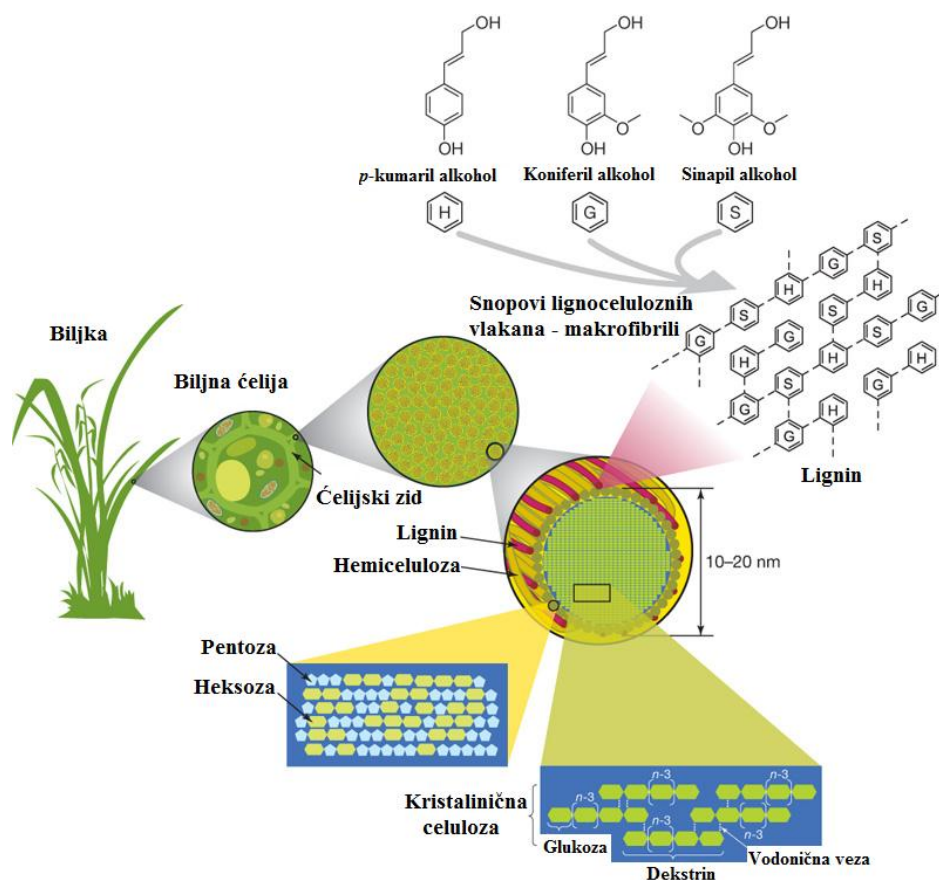
Lignocelulozna biomasa je najrasprostranjenija u biosferi jer ulazi u sastav ćelijskog zida biljaka, a sastoji se iz celuloze, hemiceluloze i lignina (Bayer i sar., 2007).

Lignocelulozne sirovine se mogu podeliti u više grupa: 1) poljoprivredni ostaci (otpaci od šećerne trske, kukuruzovina, slama od pšenice, pirinča i ječma, ljuske od pirinča, koštice od maslina itd); 2) tvrdo drvo (jasika, topola); 3) meko drvo (omorika, smrča); 4) celulozni otpad (stare novine, iskorišćeni kancelarijski papir, kaša od recikliranog papira itd); 5) biljna biomasa (lucerka i ostalo krmno bilje); 6) komunalni čvrsti otpad (Sanchez i Cardona, 2008). Šume obuhvataju oko 80% svetske biomase i predstavljaju atraktivnu sirovinu za proizvodnju bioetanola zbog dostupnosti, niske cene, velike količine, kao i mogućnosti obnavljanja (Mojović i sar., 2007).

Tečna goriva koja se proizvode iz obnovljivih lignoceluloznih izvora pružaju nekoliko pogodnosti: niže cene sirovina, povećanje obradivih površina predviđenih za poljoprivredne useve namenjene ishrani ljudi i životinja, manju upotrebu fosilnih goriva (Margeot i sar., 2009). Glavne prepreke i problemi koje je potrebno rešiti prilikom biokonverzije lignoceluloznog kompleksa do bioetanola su: izbor i optimizacija predtretmana; relativno visoki troškovi enzimske hidrolize; postizanje zadovoljavajuće konverzije šećera (uključujući pentoze) do etanola; integrisanje i poboljšanje procesa kako bi se smanjio utrošak energije i vode; karakterisanje i ocena nusproizvoda lignina i na kraju, upotreba reprezentativnih i pouzdanih podataka za procenu troškova i određivanje uticaja na životnu sredinu i socio-ekonomsku situaciju (Margeot i sar., 2009). Sprovedena su mnoga istraživanja radi unapređenja i optimizacije postojećih procesa i utvrđivanja inhibirajućih faktora koji utiču na niske prinose kod enzimske

hidrolize. Zahtevni fizičko-hemijski predtretmani sirovina, kao i visoke cene enzimskih preparata, razlozi su što je proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina još uvek, uglavnom, na laboratorijskom nivou (Margeot i sar., 2009). Uvođenje efikasne proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina imalo bi veliki značaj u proizvodnji alternativnih goriva i istovremenom iskorišćavanju šumskog i poljoprivrednog otpada.

Osnovne hemijske komponente lignocelulozne biomase su: celuloza, hemiceluloza, lignin, ekstrakti, pepeo i druga jedinjenja. Na slici 2.4. je prikazana struktura lignocelulozne biomase (Potters i sar., 2010).



Slika 2.4. Struktura lignocelulozne biomase

Celuloza je glavna komponenta ćelijskog zida viših biljaka. Celulozna vlakna obezbeđuju čvrstoću drveta i čine 40–50% njegove suve mase. Celuloza je homopolisaharidni polimer sastavljen od molekula β -D-glukopiranoze povezanih (1 \rightarrow 4)-glikozidnim vezama. Molekuli celuloze su linearni, stepen polimerizacije (n) varira od sirovine do sirovine i prosečno iznosi od 2000 do 27.000 glukoznih jedinica. Osnovna jedinica koja se u molekulu ponavlja je dimer nastao od dva anhidrovana molekula glukoze – celobioza. Svaka monomerna jedinica celuloze može formirati dve

vodonične veze sa monomerom u susjednom lancu. Vodonične veze povezuju lance u svakom sloju, pošto su inače slojevi spojeni samo slabim van der Valsovim vezama. Rezultat je veoma stabilna konfiguracija bez međumolekulskih šupljina. Kada se rešetke nativne celuloze razore, na primer jakim alkalijama, postoji mogućnost njene regeneracije. Lanci regenerisane celuloze nisu paralelni, ali su termodinamički stabilniji od nativne celuloze (Mojović i sar., 2007; Sanchez i Cardona, 2008). Hemiceluloze pripadaju grupi heteropolisaharida i čine 15–30% suve mase drveta (Mojović i sar., 2007). Hemiceluloze mekog i tvrdog drveta, iako različite strukture i sastava, hidrolizuju do monomernih komponenata: glukoze, manoze, galaktoze, ksiloze, arabinoze i malih količina ramnoze, glukuronske, metilglukuronske i galakturonske kiseline. Većina hemiceluloza ima stepen polimerizacije oko 200 (Mojović i sar., 2007). Hemiceluloze se uglavnom rastvaraju u alkalijama tako da se mogu lakše hidrolizovati. Lignin je veoma kompleksan molekul sastavljen iz fenilpropanskih jedinica. Mada su osnovni strukturni elementi lignina poznati, neke njegove hemijske karakteristike ostaju nejasne. Biosintetički lignin nastaje iz glukoze preko formiranja tri prekursora alkohola: kumaril, koniferil i sinapil alkohol. Drvo ima visok sadržaj lignina.

Molekuli celuloze, hemiceluloze i lignina grade vlaknaste strukture – mikrofibrile, koji se povezuju u snopove gradeći složenije strukture – makrofibrile (slika 2.4). Hemijske veze između lignina i hemiceluloze i celuloze su estarske, etarske i glikozidne. Etarske veze su stabilnije u poređenju sa estarskim između lignina i ugljenih hidrata. Ove veze čine lignin izuzetno otpornim prema hemijskoj i enzimskoj razgradnji, dok biološku razgradnju omogućuju mnoge gljive i određene aktinomicete. Ekstrakti su jedna od glavnih komponenata drvnog materijala, a rastvorljivi su u nepolarnim organskim rastvaračima i vodi. Sastoje se iz velikog broja lipofilnih i hidrofilnih komponenata. Ekstrakti se mogu klasifikovati u četiri grupe: 1) terpenoidni i stereoidni, 2) masti i voskovi, 3) fenolna jedinjenja i 4) neorganske komponente (Mojović i sar., 2007).

2.4. Sporedni proizvodi različitih tehnoloških postupaka

Najčešće korišćeni sporedni proizvodi u proizvodnji bioetanola su:

Melasa šećerne repe i šećerne trske, sporedni proizvod industrije šećera – sirup koji nastaje pri poslednjem stepenu kristalizacije u postupku prerade šećernih sirovina. Sadrži preko 46% saharoze. Proizvodnjom etanola iz melase nastaju veoma toksične otpadne vode, za čije rešavanje su potrebna značajna ulaganja. Takođe, melasa se sve više koristi za bioethnološku proizvodnju drugih proizvoda: organskih kiselina, aminokiselina, rastvarača, vitamina itd. Iz ovih razloga melasa ne predstavlja sirovinu od velikog značaja za proizvodnju bioetanola trenutno niti u budućnosti.

Otpadne vode tehnologije skrobnih sirovina, najčešće iz industrije prerade krompira sadrže skrob pa se mogu koristiti kao sirovine za proizvodnju bioetanola.

Otpadni sulfitni rastvori iz industrije papira sadrže glukozu i druge fermentabilne šećere, ali se prethodno iz njih mora ukloniti SO₂ koji inhibira rast mikroorganizama.

Surutka je tečna faza koja se dobija u proizvodnji mlečnih proizvoda i zbog relativno velikog sadržaja laktoze (70-80%) u odnosu na suhu materiju može se koristiti kao sirovina u proizvodnji bioetanola.

Sporedni proizvodi različitih tehnoloških postupaka kao sirovine za proizvodnju bioetanola imaju nekoliko prednosti među kojima su niska cena i generalno pozitivni ekološki uticaj jer se time dodatno smanjuje zagađenost. Nedostaci primene ovih sirovina su relativno nizak sadržaj fermentabilnih šećera, potreba za dodavanjem nutrijenata i konkurencija sa postojećim tržištem hrane za životinje (Mojović i sar., 2007).

3. KUKURUZ KAO SIROVINA ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA, SKROBA I HRANE ZA ŽIVOTINJE

3.1. Kukuruz kao sirovina

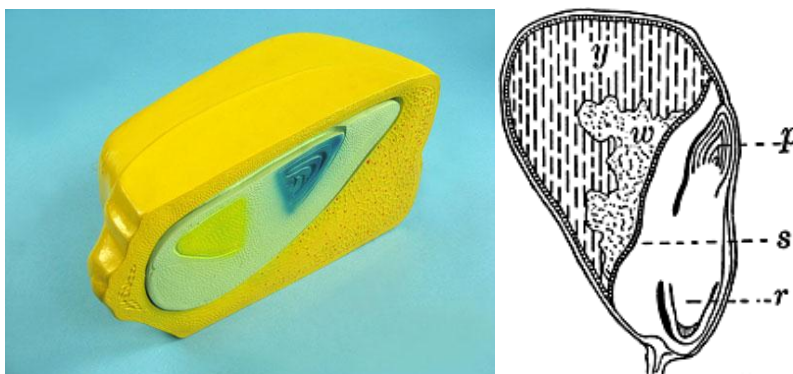
Kukuruz (*Zea mays*) (slika 3.1) je jednogodišnja biljka iz porodice *Poaceae* koja daje zrnast plod, najčešće žute ili bele boje, prosečne visine 2,5 m. Poreklo vodi iz Srednje Amerike, a u Evropu je prenet krajem 15. i početkom 16. veka. Rod kukuruza (*Zea*) obuhvata samo jednu vrstu i više tipova, kao i veoma veliki broj hibrida u okviru tipova, međusobno različitih u pogledu hemijskog sastava i strukture zrna. Današnji kukuruz predstavlja rezultat viševekovnih spontanih i neprekidnih mutacija, kultivisanog gajenja kroz civilizacijski razvoj i primene različitih metoda selekcije (Milašinović, 2005).



Slika 3.1. Kukuruz (*Zea mays*)

Sa industrijskom revolucijom kukuruz je postao tražena sirovina ne samo za pripremanje hrane već i za rafinaciju niza industrijskih proizvoda – skroba, grizeva, glutena, ulja, alkohola, napitaka. Danas je zanimljiv i lignocelulozni deo biljke kao sirovina za proizvodnju bioetanola, papira, ambalaže, iverice, kartona i niza drugih tehničkih proizvoda. Zbog značaja koji ima kukuruz je predmet istraživanja velikog broja istraživača različitih naučnih disciplina, počev od agronomskih i bioloških do medicinskih i arheoloških (Bekrić, 1997).

Zrno kukuruza sastoji se od četiri osnovne frakcije: korena zrna (1-2% zrna uglavnom celuloza), perikarpa (omotača) (5,5-6% zrna uglavnom celuloza), klice (10 - 14% mase zrna – sadrži najviše ulja, proteina i ugljenih hidrata), brašnastog (mekog) i staklastog (tvrdog) endosperma (zajedno čine 82% suve materije zrna - sadrže najviše skroba, proteine i masti), kao što je prikazano na slici 3.2. (Baras i Šušić, 1982; Gulati, 1996).



Slika 3.2. Poprečni presek zrna kukuruza: y - staklasti endosperm, w - brašnasti endosperm: p - klica; s - perikarp, r - koren zrna

Prema sastavu zrna odnosno sadržaju skroba, kukuruz se može podeliti na nekoliko osnovnih podvrsta:

- Brašnasti — *Zea mays* var. *amylacea*
- Kokičar — *Zea mays* var. *everta*
- Zuban — *Zea mays* var. *indentata*
- Tvrđunac — *Zea mays* var. *indurata*
- Šećerac — *Zea mays* var. *saccharata* i *Zea mays* var. *rugosa*
- Voskovac — *Zea mays* var. *ceratina*
- Visokoamilozni — *Zea mays*
- Plevičar — *Zea mays* var. *tunicata*
- Kukuruz prugastog lista — *Zea mays* var. *japonica*

Brašnaste podvrste su bogatije skrobom i lipidima od tvrđunaca koji sadrže više proteina. Kukuruz zuban je u sredini prema sadržaju skroba, ali sadrži manje ulja od brašnastog i tvrđunca. Prosečan sadržaj proteina u različitim tipovima kukuruza kreće se između 6 i 12% računato na suhu materiju. Oko 75% proteina se nalazi u endospermu, a ostatak je raspoređen u klici i perikarpu. Četiri glavne grupe proteina u kukuruzu: albumini, globulini, glutelin i zein, određene su prvenstveno svojom rastvorljivošću u određenim rastvaračima (tabela 3.1) (Shukla i Cheryan, 2001). Zeinska (prolaminska) frakcija određuje tvrdoću endosperma zrna. Zein je deficitaran u esencijalnim amino

kiselinama, kao što su lizin i triptofan što smanjuje njegovu hranljivu vrednost, a njegova nerastvorljivost u vodi ograničava primenu u prehrambenim proizvodima za ljudsku upotrebu (Shukla i Cheryan, 2001).

Tabela 3.1. Raspodela proteinskih frakcija u zrnu kukuruza (% suve materije)

Protein	Rastvarač	Celo zrno	Endosperm	Perikarp
Albumini	Voda	8	4	30
Globulini	So	9	4	30
Glutelin	Baze	40	39	25
Zein	Alkohol	39	47	5

U zrnu su zastupljeni i minerali: Ca, P, K, Fe, Mg, Na, Cl i S; provitamini i vitamini: β -karoten, vitamin A, tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotenska kiselina (B₅) i vitamin E (Baras i Šušić, 1982; Gulati, 1996.a).

Prosečni hemijski sastav osnovnih frakcija zrna kukuruza tvrduca prikazan je u tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Hemijskih sastav strukturnih delova zrna kukuruza (Gulati, 1996)

Frakcija	Endosperm	Klica	Perikarp
Skrob, %	98,0	1,4	0,6
Proteini, %	74,8	22,4	2,8
Masti, %	14,5	83,7	1,8
Rastvorljivi ugljeni hidrati, %	28,1	70,2	1,7
Celuloza, hemiceluloza, lignin, %	27,0	21,9	51,1
Pepeo, %	16,5	79,7	3,8

Hemijski sastav kukuruznog zrna može biti veoma različit i zavisi od tipa kukuruza, klimatskih uslova, primenjenih agrotehničkih mera, sastava zemljišta itd. U tabeli 3.3. prikazane su srednje vrednosti osnovnog hemijskog sastava sušenog i skladištenog merkantilnog kukuruza (Mojović i sar., 2007; Pieper i Pönitz 1973).

Tabela 3.3. Srednje vrednosti osnovnog hemijskog sastava sušenog i skladištenog merkantilnog kukuruza

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

Posmatrano u svetskim razmerama kukuruz je kako po požnjevenim površinama i proizvedenim količinama tako i po upotrebnoj vrednosti zrna jedna od najznačajnijih biljnih vrsta (Radosavljević i sar., 2009). Najveća proizvodnja kukuruza je u SAD (42%), Aziji (26%), Evropi (12%) i Južnoj Americi (9%). Sjedinjene Američke Države su najveći proizvođač u ukupnoj svetskoj proizvodnji kukuruza, posebno u takozvanom „američkom kukuruznom pojasu“ (engl. „U.S. Corn-Belt“) (Milašinović, 2005). Srbija se ubraja među značajne proizvođače kukuruza ne samo u Evropi već i u svetu (tabela 3.4) (Agrostats, 2012; Corn Refiners Association, 2012).

Tabela 3.4. Proizvodnja kukuruza u svetu u periodu 2005-2010 godine, izražena u hiljadama tona

Godina	2005/6	2006/7	2007/8	2008/9	2009/10
Proizvođač	Proizvodnja				
Argentina	15 800	22 500	22 000	12 600	14 000
Brazil	41 700	51 000	58 600	51 000	52 000
Kanada	9 332	8 990	11 649	10 592	9 700
Kina	139 365	151 600	152 300	165 900	155 000
Egipat	5 932	6 149	6 174	6 217	6 300
EU-27	60 668	53 829	47 554	62 688	56 572
Indija	14 710	15 100	18 960	18 480	18 500
Indonezija	6 800	7 850	8 500	8 700	9 000
Meksiko	19 500	22 350	23 600	25 000	22 500
Nigerija	7 000	7 800	6 500	7 900	8 300
Filipini	5 884	6 231	7 277	6 846	6 850
Srbija	6 600	6 415	4 054	5 900	6 400
Južna Afrika	6 935	7 300	13 164	12 750	10 500
Ukrajina	7 150	6 400	7 400	11 400	9 000
Vijetnam	3 818	4 251	4 600	4 530	4 800
Ostalo	71 929	67 112	68 361	73 396	72 449
Međuzbir	416 523	444 877	460 693	483 899	461 871
SAD	282 263	267 503	331 177	307 386	330 674
Ukupno	698 786	712 380	791 870	791 285	792 545

U Srbiji je 2010. godine 57,5% površina oranica i bašta bilo zasejano žitaricama, od toga kukuruzom 1,23 miliona hektara a svega 493 hiljade hektara pšenicom (Statistički godišnjak Republike Srbije, 2011). Ostvarena proizvodnja kukuruza u Srbiji u 2010. godini u odnosu na 2009. godinu povećana je za 12,7% (Statistički godišnjak Republike Srbije, 2011). Proizvodnja kukuruza u Republici Srbiji u periodu od 2008. do 2010. godine prikazana je u tabeli 3.5. (Statistički godišnjak Republike Srbije, 2011).

Tabela 3.5. Proizvodnja kukuruza u Republici Srbiji u periodu 2008-2010. godine

Godina	Zasejana površina, ha	Požnjevena površina, ha	Proizvodnja, t	Prinos po ha, t
2008.	1.277.000	1.273.908	6.158.122	4,8
2009.	1.211.000	1.208.640	6.396.262	5,3
2010.	1.235.000	1.229.573	7.207.191	5,9

U našoj zemlji struktura potrošnje kukuruza je veoma nepovoljna. Više od 90% ukupno proizvedenog kukuruza odlazi u hranu za životinje, direktnu ili industrijski dorađenu, a ostatak za proizvodnju prehrambenih proizvoda i alkohola (Milašinović, 2005; Statistički godišnjak Republike Srbije, 2011).

Kao visoko prinosa ugljenohidratna biljka kukuruz je veoma kompetetivan u odnosu na ostala žita. Kukuruzno zrno sadrži u proseku oko 70% skroba i najznačajnija je sirovina za proizvodnju komercijalnog skroba, kako u našoj zemlji, tako i u svetu (Milašinović i sar., 2007). U ukupnoj svetskoj proizvodnji skroba kukuruz kao sirovina učestvuje sa 83%, krompir i pšenica sa po 6%, kasava sa 4% i ostale sirovine sa 1% (Radosavljević, 2001). U savremenim procesima prerade kukuruza tehnološku vrednost zrna najvećim delom opredeljuju tipovi endosperma zbog čega je od posebnog značaja uočiti razlike u fizičkim karakteristikama i hemijskom sastavu hibrida sa različitim osobinama endosperma (Radosavljević i Milašinović, 2008). Kukuruzni skrob kao osnovni proizvod primarne skrobarske prerade predstavlja polaznu sirovinu za brojne procese transformacije u daljoj industrijskoj proizvodnji, odnosno višim fazama skrobarske prerade (Milašinović, 2005). Stoga, danas postoji čitav niz proizvoda koji se dobijaju iz kukuruznog skroba.

Istraživanja kvaliteta i tehnološke vrednosti zrna predstavljaju doprinos boljoj valorizaciji kukuruza u industrijskoj preradi, koja je u našoj zemlji skoro simbolično zastupljena, a pre svega u proizvodnji visokovredne hrane i tehničkih proizvoda što ima za cilj povećanje ekonomske vrednosti ove, za našu zemlju najznačajnije, prirodno obnovljive ugljenohidratne sirovine (Radosavljević i sar., 2002).

Kukuruz je jedna od važnijih sirovina koja se u Severnoj Americi i Evropi koristi za proizvodnju etanola. S obzirom da proizvodnja kukuruza u Srbiji premašuje domaće potrebe, viškovi bi se mogli korisno upotrebiti za proizvodnju ovog alternativnog goriva, što bi oslobodilo našu zemlju od uvoza oko 2,5 miliona tona nafte godišnje (Baras i Šušić, 1982; Rakin i sar., 2006)

U svetu danas postoji veliko interesovanje za uzgajanjem hibrida kukuruza čijom bi se primenom pospešila proizvodnja bioetanola. Razvijeni su hibridi sa većim sadržajem fermentabilnih šećera, a radi se na kreiranju hibrida sa modifikovanim karakteristikama skroba (Nikolić, 2009). Ranije sprovedene studije su pokazale da se veliki prinosi etanola mogu postići iz zrna koja sadrže više skroba a manje proteina i lipida (Wu i sar., 2006; Srichuwong i sar., 2009). Pored toga, pokazalo se da zrna kukuruza koja sadrže skrob sa većim udelom kratkih lanaca amilopektina potpunije hidrolizuju do glukoze tokom alkoholne fermentacije (Srichuwong i sar., 2009).

To znači da sastav zrna i struktura skroba predstavljaju presudne faktore u predviđanju prinosa bioetanola iz kukuruza. Sastav zrna i struktura skroba određeni su genetičkim poreklom kukuruza ali na njih takođe utiču i uslovi sredine (na primer temperatura u toku rasta i vlaga zemljišta) (Asaoka i sar., 1984, 1985, 1987; Shi i sar., 1994; Tester i sar., 1995; Lu i sar., 1996). Zaključci istraživanja uticaja datuma setve na strukturu skroba mogu se pronaći u literaturi ali su rezultati neusaglašeni. Pokazalo se da se sadržaj amiloze u skrobu ne menja sa datumom setve pirinča (Williams i sar., 1958), normalnog (običnog) kukuruza (Campbell i sar., 1994), i slatkog krompira (Noda i sar., 2001). Kod visokoamiloznog kukuruza se pokazalo da se sadržaj amiloze u skrobu povećava kasnijom setvom (Helm i sar., 1968), dok se kod pšenice smanjio sa odlaganjem vremena sejanja (Singh i sar., 2010). Nije primećen uticaj datuma sejanja na dužinu grana lanaca amilopektina kod kukuruza šećerca (Noda i sar., 2001).

Pokazalo se da faktori kao što su sušenje zrna i uslovi skladištenja posle žetve utiču na kvalitet i stabilnost zrna u toku skladištenja. Zrna kukuruza sušena na povišenim temperaturama ($>70^{\circ}\text{C}$) ispoljila su veći stepen lomljenja pri upotrebi (Hooseney 1986; Peplinski i sar., 1994), izmenjena svojstva skroba (Haros i sar., 2003; Altay i Gunasekaran, 2006; Malumba i sar., 2009), kao i smanjenu rastvorljivost proteina kukuruza, kapacitet vezivanja vode za protein, i enzimsku aktivnost (Wall i sar., 1975; Eckoff i sar., 1991).

Dve velike kompanije koje se bave proizvodnjom semena u SAD, „Pioneer“ i „Monsanto“, ulažu napore da identifikuju i razviju nove hibride kukuruza, ispituju uticaj sredine na njihov rast, kao i uticaj karakteristika hibrida na sastav korisnih sporednih proizvoda industrije bioetanola (Nikolić, 2009). Obe kompanije su kreirale komercijalne hibride kukuruza specijalno namenjene za proizvodnju bioetanola čijom primenom je moguće ostvariti i do 4% viši prinos ovog alternativnog goriva od prinosa koji se

ostvaruje upotrebom hibrida standardnog hemijskog sastava zrna (što bi za proizvodnju etanola od $150 \cdot 10^6$ l godišnje značilo povećanje profita od 1-2 miliona dolara).

U svetu je najizraženiji trend razvoja integralne tehnologije u kojoj bi sporedni proizvodi industrije bioetanola bili maksimalno valorizovani, čime se ostvaruje veća produktivnost uz minimalno zagađenje životne sredine (Rakin i sar., 2009). Proizvodnjom bioetanola iz kukuruza dobija se sporedni proizvod poznat kao kukuruzna džibra.

Kukuruzna džibra je relativno jeftina, dostupna u velikim količinama ali ima ograničenu industrijsku primenu. Na svaki galon (3,78 litara) bioetanola proizvedenog od zrna kukuruza nastaje oko 3,36 kg suve kukuruzne džibre (Pimentel, 2003). Ovaj sporedni proizvod industrije bioetanola predstavlja odličan izvor proteina i energije za životinje pa se zbog toga najčešće koristi kao komponenta smeša za ishranu domaćih životinja. I pored toga, često se javlja problem skladištenja i uklanjanja neiskorišćene džibre (Mojović i sar., 2009; Rakin i sar., 2009.a; Pejin i sar., 2009). Dok se uzgajivači domaćih životinja prilagođavaju rastu cena hraniva, perspektiva uključivanja suve kukuruzne džibre iz proizvodnje bioetanola u udelu većem od tradicionalnog postaje pitanje vredno razmatranja (Beckman, 2011).

3.2. Kukuruzni skrob

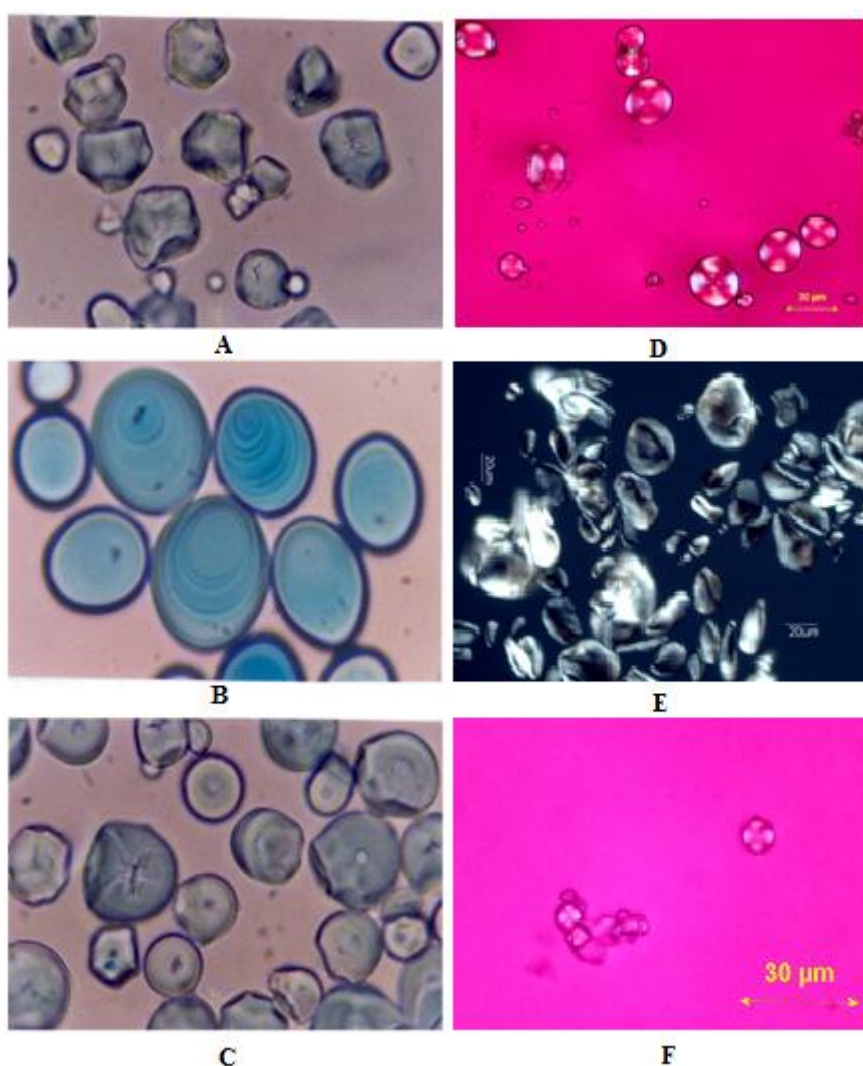
Skrob je polisaharid veoma rasprostranjen u prirodi. To je rezervni ugljeni hidrat biljaka koji se najviše skladišti u korenu, krtolama i semenu u obliku karakterističnih zrnaca (skrobnih granula). Javlja se u obliku belog amornog praha koji se ne rastvara u vodi (Piletić i sar., 1993).

Skrob se hiljadama godina koristio za razne namene, a oko 800. godine pre nove ere prvi put je označen kao supstanca kada je izolovan iz zrna žitarica u vidu belog praha za primenu u kozmetici i medicini. U Kini je još oko 1000. godine pre nove ere bila poznata tehnologija proizvodnje zaslađivača od pirinčanog skroba. Nemački naziv za skrob „Stärke“, odakle smo i preuzeli reč – štirak, znači jak ili čvrst zbog svojstva učvršćivanja tekstila.

Naučna istraživanja sprovedena u cilju razumevanja ove supstance započinju tek 1716. godine kada je Levenhuk (Leeuwenhoek) pod mikroskopom uočio granularnu strukturu skroba. Početkom 19. veka Kirhof (Kirchhoff) je otkrio da se skrob može

prevesti u šećere hidrolizom sa razblaženom sumpornom kiselinom (Seetharaman i sar., 2012).

Granule skroba različitih biljaka razlikuju se po obliku, veličini i drugim fizičkim karakteristikama (slika 3.3). Granule skroba krompira su najkrupnije, a najsitnije pirinča i prosa. Granule kukuruznog skroba javljaju se u dva oblika u zavisnosti od porekla kukuruza. U brašnastim delovima endosperma se nalaze uglavnom okrugle granule skroba, a u staklastim granule poliedarskog oblika. U zavisnosti od vrste biljke, veličina granula skroba varira od 3 do 50 μm (Nikolić, 2009), kod kukuruza se kreće u rasponu od 5 do 25 μm (Baras, 1982; Jeremić i sar., 2000).



Slika 3.3. Skrobne granule: A) kukuruza, B) krompira, C) kasave (tapioke), D) pšenice, E) banane i F) ovsu pod svetlosnim mikroskopom (Mishra i Rai, 2006)

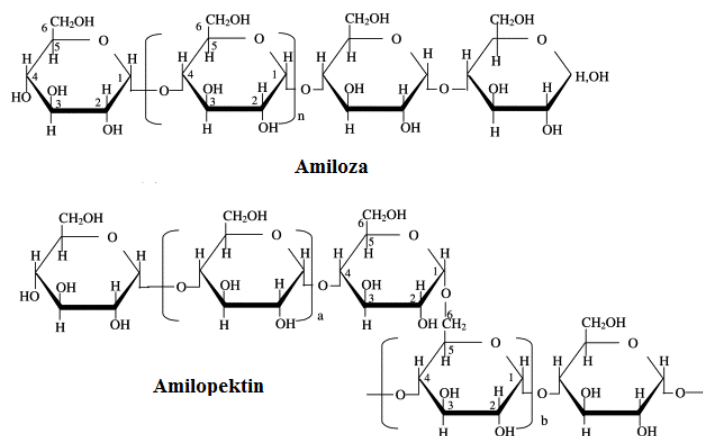
Po svojoj hemijskoj strukturi skrob je polisaharid sastavljen od velikog broja monosaharida glukoze povezanih α -D-(1-4) i/ili α -D-(1-6) glikozidnim vezama. Bruto formula skroba je $(C_6H_{10}O_5)_n$. Skrob se sastoji od dve osnovne strukturne komponente – amiloze i amilopektina. Amiloza čini 14 do 27% makromolekula skroba u zavisnosti od vrste biljke (Jeremić i sar., 2000). Skrobovi određenih vrsta kukuruza, ječma i pirinča označeni kao voštani sadrže iznad 90% amilopektina, a najčistiji sadrže samo amilopektin. Nasuprot tome, poznati su i skrobovi sa visokim sadržajem amiloze, kao što je slučaj kod visokoamiloznog kukuruza gde se sadržaj amiloze kreće od 55 do 85% (Radosavljević i sar., 2009.a). Iako su i amiloza i amilopektin izgrađeni isključivo od α -D-glukoze kao monosaharidne komponente, međusobno se znatno razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama (tabela 3.6) (Stojanović i sar., 2000).

Tabela 3.6. Razlike u ponašanju amiloze i amilopektina

	Amiloza	Amilopektin
Razlaganje β -amilazom	~100%	~50%
Stepen polimerizacije	600-1600	>10000
Reakcija sa jodom	Tamnoplavo obojenje	Purpurno ili crveno obojenje
Kompleks sa n-butanolom	Gradi	Ne gradi
Adsorpcija na celulozi	Dobra	Slaba
Odnos neredukujućih i redukujućih krajnjih grupa	1:1	100 n:1

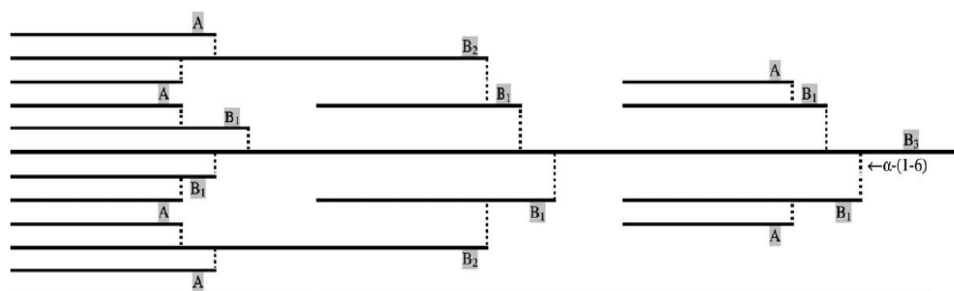
Amiloza je u osnovi pretežno linearan polimer u kome su glukozne jedinice povezane α -D-(1-4) vezama (slika 3.4), ali sadrži i manji broj grana povezanih α -D-(1-6) vezama. Stepenn polimerizacije (DP) može biti i do 6000, a molekulska masa od 105 do 106 Da. Lanci amiloze lako obrazuju pojedinačne ili dvostruke helikse (zavojnice). Na bazi difrakcije X-zraka uočeno je prisustvo dva tipa kristalne strukture amiloze, tip A i tip B (Galliard, 1987). Strukturni elementi tipa B su dvostruki heliksi, antiparalelno upakovani u heksagonalni model. Centralni kanal, okružen sa šest dvostrukih heliksa, ispunjen je vodom (36 H₂O po jedinici). Tip A je veoma sličan tipu B osim što se u centralnom kanalu nalazi još jedna dvostruka zavojnica (koja upakovane helikse čini još bliže jedne drugima). Kod ovog tipa samo osam molekula vode po jedinici se nalaze između dvostrukih heliksa. Odnos redukujućih i neredukujućih krajnjih grupa u molekulu amiloze je 1:1. Amiloza sa jodom daje plavo obojenje, a intenzitet obojenja varira u zavisnosti od dužine niza amiloze (Stojanović i sar., 2000).

Amilopektin, veći i razgranati molekul sa α -D-(1-4) i α -D-(1-6) vezama, je glavna komponenta skroba (slika 3.4). Amilopektin ne gradi komplekse sa organskim rastvaračima, a sa jodom gradi komplekse crvene boje (Stojanović i sar., 2000).



Slika 3.4. Strukture amiloze i amilopektina (Tester i sar., 2004.a)

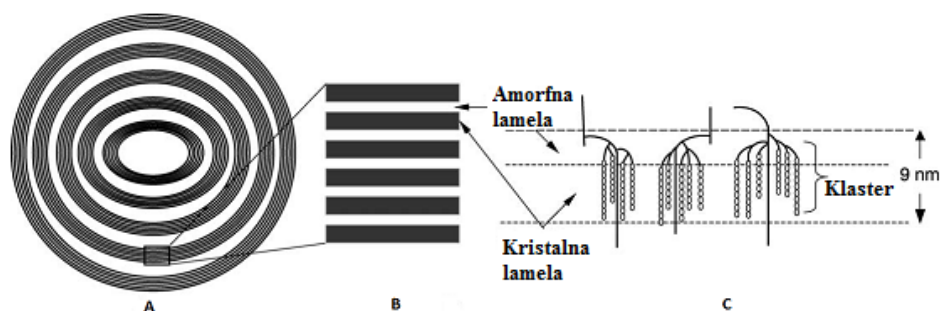
Amilopektin (10^7 do 10^9 Da), visoko razgranate strukture i prosečnog stepena polimerizacije od 2 miliona, je jedan od najvećih molekula koji se nalaze u prirodi. Tipična dužina lanaca amilopektina iznosi 20 do 25 glukoznih jedinica između tački grananja. Njegova struktura se najčešće opisuje preko „klaster“ modela (slika 3.5) koji dobija veći značaj nakon Hizukurijevog postulata da su lanci amilopektina locirani kako unutar jednog „klastera“ tako i da povezuju dva ili više „klastera“ (Hizukuri, 1986; Thompson, 2000).



Slika 3.5. Šematski prikaz dela amilopektinskog makromolekula ("klaster" struktura) (Hizukuri, 1986)

Kratki lanci (A) sa stepenom polimerizacije 12-16 koji mogu obrazovati duple helikse su uređeni u „klaster“ strukturu. „Klaster“ sadrži 80% do 90% ovih lanaca a oni su vezani za duže lance (B) koji čine preostalih 10% do 20% lanaca. Većina B lanaca

povezuju dva (DP oko 40) ili tri (DP oko 70) „klastera“, a neki čak i više „klastera“ (DP oko 110). Na bazi difrakcije X zraka skrobne granule ispoljavaju semikristalni karakter koji je pokazatelj visokog stepena orijentacije glukanskog molekula. Oko 70% skrobne granule su amornog karaktera, a samo 30% su kristalnog karaktera. Amorfni region pretežno čine makromolekuli amiloze dok je amilopektin mnogo manje zastupljen. Kristalni region pretežno čine makromolekuli amilopektina (Tester i sar., 2004; Jane, 2006; Copeland i sar., 2009). Na slici 3.6. prikazana je lamelarna struktura skrobnih granula.



Slika 3.6. Dijagramski prikaz lamelarne strukture skrobne granule (Donald i sar., 1997). (A) Mikrokristalne lamele odvojene amornim koncentričnim prstenovima. (B) Uveličana slika amornog i kristalnog regiona. (C) Duple helikoidne strukture koje formiraju susedni lanci amilopektina utiču na porast kristalnosti lamela.

Osnovne komponente skroba, amiloza i amilopektin iako su izgrađeni samo od α -D-glukoze kao monosaharidne komponente, međusobno se znatno razlikuju po svojim funkcionalnim osobinama (Jane, 2004). Odnos amiloze i amilopektina u skrobnim granulama predstavlja jedan od najvažnijih parametara koji značajno utiče na funkcionalne osobine skroba (Jane i sar., 1999). Skrobovi koji sadrže samo jednu polisaharidnu komponentu, imaju specifične osobine i kao takvi proširuju primenu skroba, odnosno kukuruza i otvaraju nove mogućnosti posebnih primena, za koje običan kukuruzni skrob ne može da se koristi.

Sadržaj amiloze ima veoma važnu ulogu u enzimskoj svarljivosti skrobnih granula. Skoro svi voštani skrobovi se lakše razgrađuju nego normalni, a ovi lakše od visokoamiloznih. Navedene razlike se mogu pripisati preplitanju amiloze i amilopektina što smanjuje moć bubrenja granula čineći ih tako manje dostupnim enzimima.

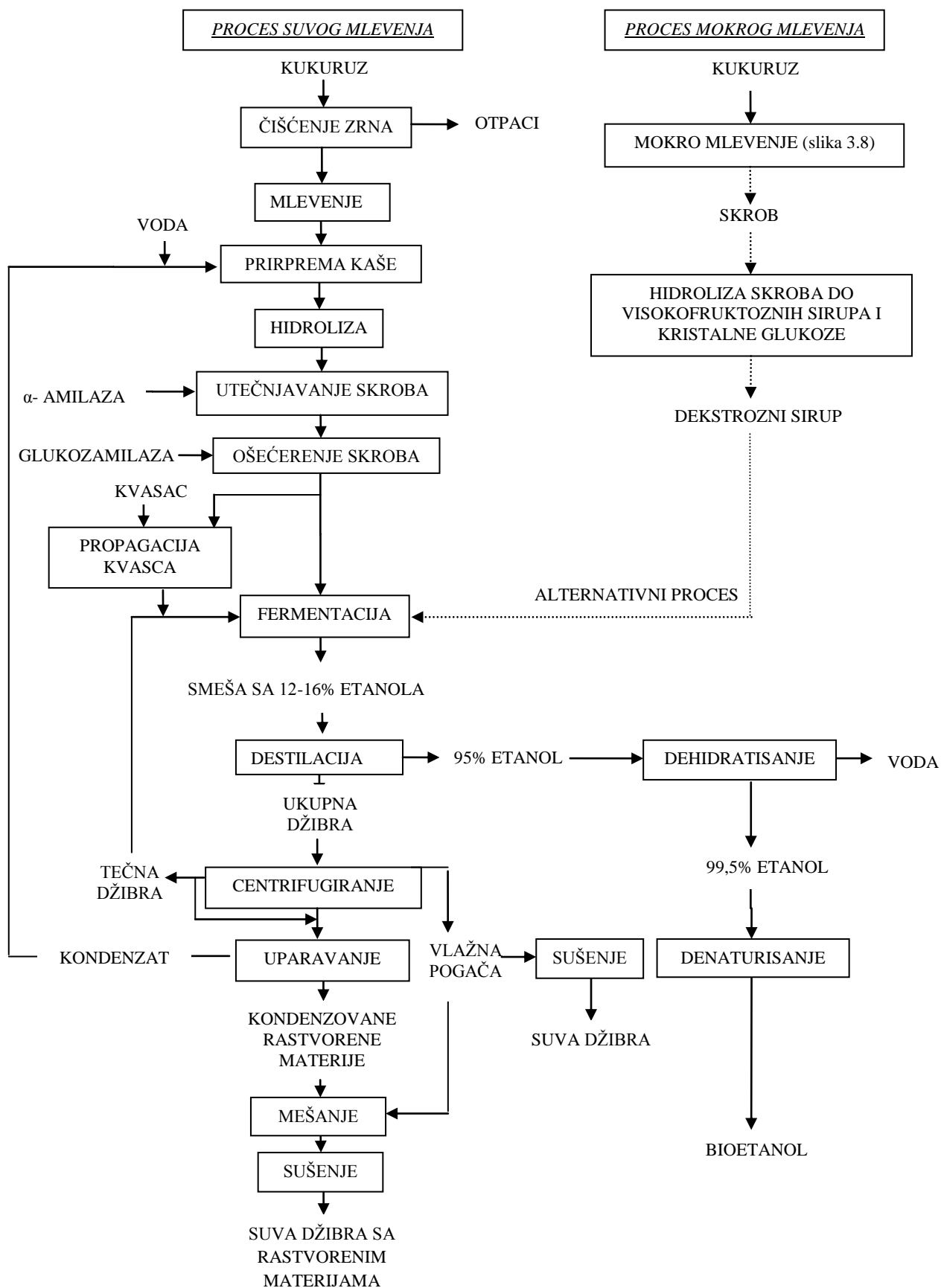
3.3. Tehnologije prerade zrna kukuruza

Postoje dve osnovne tehnologije prerade kukuruznog zrna koje se primenjuju u proizvodnji etanola i skroba: 1) proces suvog mlevenja (mlinarska prerada) i 2) proces mokrog mlevenja (skrobarska prerada). Iako se proces suvog mlevenja već više decenija pretežno primenjuje u industriji bioetanola, moguća je i primena kako postupka suvog mlevenja tako i integrisanog procesa dva navedena vida prerade (Johnson, 1994). Poslednjih godina vrše se istraživanja u cilju unapređenja procesa proizvodnje bioetanola integrisanjem suvog i mokrog postupka prerade kukuruza (Nikolov i sar., 2012; Lohrmann i sar., 2008).

3.3.1. Suva prerada zrna kukuruza

Postupak suvog mlevenja se osim u mlinarsko-pekarskoj industriji najčešće primenjuje u proizvodnji bioetanola. Najznačajniji nusprodukti proizvodnje bioetanola su ugljen-dioksid i džibra (Mojović i sar., 2009). Prosečan prinos ukupne džibre koji nastaje u proizvodnji bioetanola iznosi oko 13 hl po hektolitr bioetanola (Kim i sar., 1997). Sastav džibre čine sve komponente polaznih sirovina osim u fermentaciji iskorišćeni ugljeni hidrati, zatim biomasa kvasca, kao i novonastali međuproizvodi faza utečnjavanja (likvefakcije), ošecerena (saharifikacije) i fermentacije koje kvasac može da metaboliše do etanola (Radosavljević, 2005).

Šema procesa proizvodnje bioetanola procesom suvog mlevenja zrna kukuruza prikazana je na levoj strani slike 3.7. (Johnson, 1994; Erickson i sar., 2005).



Slika 3.7. Integralna šema proizvodnje bioetanola procesima suvog i mokrog mlevenja

U procesu suve prerade se celo zrno melje i koristi u postupku fermentacije dok se u mokroj preradi koriste samo fermentabilni šećeri dobijeni hidrolizom skroba (slika 3.7). Kod suve prerade, prethodno samleveno zrno uvodi se u reaktor za utečnjavanje skroba u kome se meša sa vodom da bi se dobila kaša, a zatim se dodaju enzimi kako bi se skrob hidrolizom razložio do fermentabilnih šećera (slika 3.7). Posle likvefakcije sledi saharifikacija – druga faza hidrolize u kojoj se utečnjen skrob razlaže do glukoze, maltoze i graničnih dekstrina. Potom sledi fermentacija u kojoj se pomoću kvasca fermentabilni šećeri prevode u etanol. Etanol se izdvaja iz fermentisane podloge u destilacionim kolonama. Etanol i suva džibra čine prema prinosima glavne proizvode suvog postupka prerade zrna kukuruza.

Voda i čvrste (nerastvorene) supstance koje ostanu posle destilacije etanola nazivaju se **ukupna džibra** (eng. *whole stillage*), i ona se sastoji prvenstveno od vode, vlakana, proteina i masti. Pored neizmenjenih polaznih supstanci iz sirovine, džibra sadrži ćelije kvasca i produkte metabolizma kvasca iz procesa fermentacije kao što su vitamini B grupe i neki faktori rasta (Mojović i sar., 2010). Ukupna džibra se centrifugira kako bi se izdvojile nerastvorene čvrste materije od tečnosti. Čvrste materije, koje uglavnom čine vlakna (celuloza, hemiceluloza, lignin) se još nazivaju i **vlažna pogača ili sveža džibra** (eng. *wet cake*). Sveža džibra se može koristiti kao hrana za životinje na farmama u neposrednoj blizini fabrika etanola, jer je vrlo podložna kvarenju. Sveža džibra sadrži 7-10% suve materije, od čega su 80% suspendovani, i oko 20% rastvorljivi sastojci. Ona sadrži sirove proteine, masti, mineralne supstance i vitamine. Veći deo proteina i gotovo svi vitamini i faktori rasta potiču od kvasca. Za razliku od nje, suva džibra je stabilna i može se koristiti kao komponenta hrane za životinje tokom cele godine (Mojović. i sar., 2007). U velikom broju industrijskih postrojenja u Srbiji ova džibra se ne iskorišćava, pri čemu predstavlja značajan ekološki problem sa BPK zagađenjem od 15-340 g·l⁻¹ (Rakin i sar., 2009).

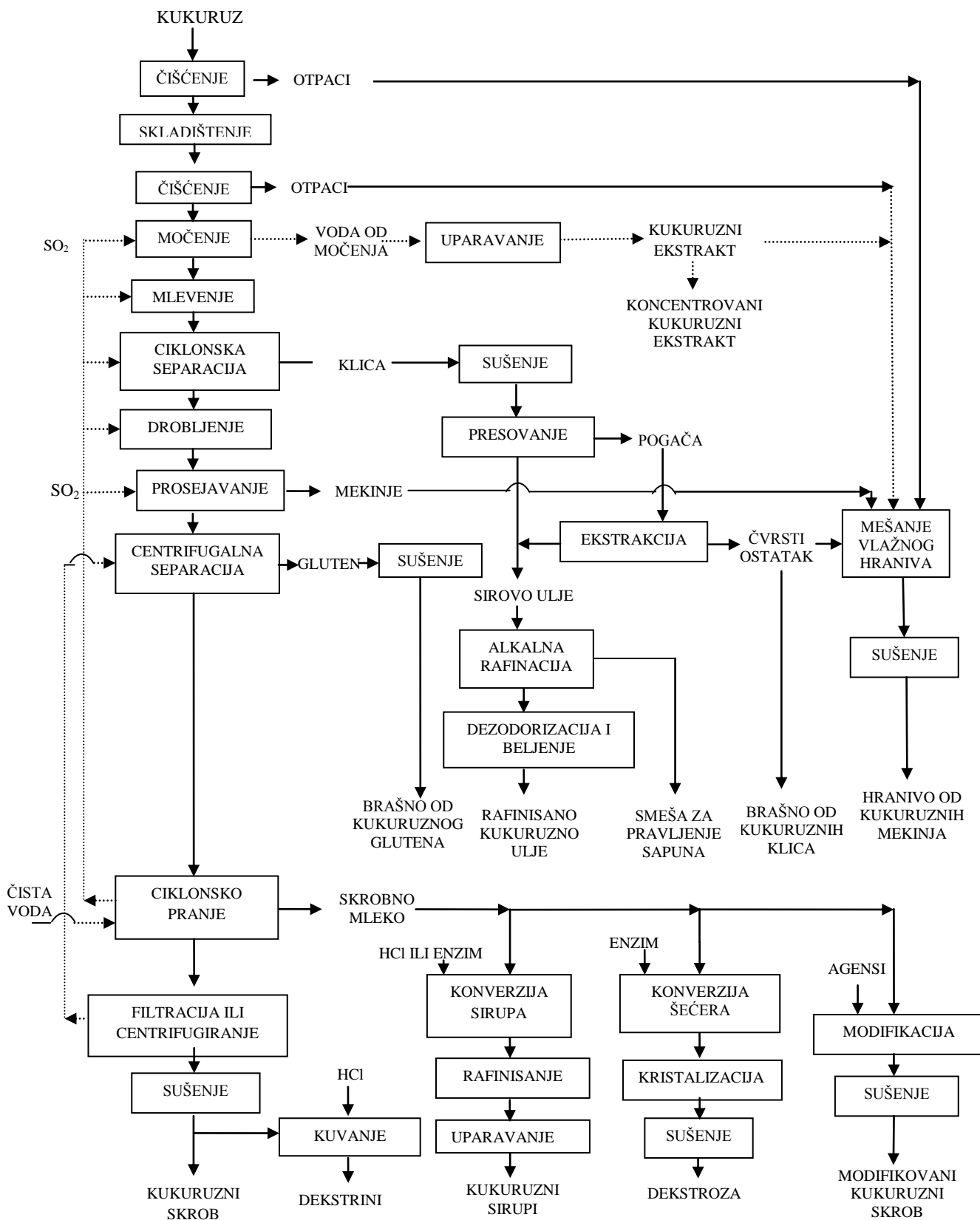
Sušenjem se dobija **suva kukuruzna džibra** (eng. *dried distillers' grains ili DDG*). Tokom proizvodnje etanola iz kukuruza, na 1000 kg utrošenog kukuruza sa 12% vlage i 65% skroba (preračunato na suhu materiju), nastaje 229 kg suve džibre sa 90% suve materije, pri tom se dobija 293 kg etanola (Pejin i sar., 2000).

Jedan od sporednih proizvoda koji nastaju u postupku dobijanja bioetanola alkoholnim vrenjem je **tečna ili bistra džibra** (eng. *thin stillage*) (Tasić i sar., 2006; Đukić-Vuković i sar., 2011). Nakon centrifugiranja profermentisanog medijuma i izdvajanja etanola destilacijom zaostaje tečna frakcija, žućkaste boje koja je lako

mešljiva sa vodom (Đukić-Vuković i sar., 2011). Prilikom proizvodnje 1 hl bioetanola nastaje oko 13 hl bistre džibre (Kim i sar., 1997). Jedan deo tečne džibre (30-50%) se može reciklirati u proces proizvodnje etanola kako bi se obezbedili nutrijenti za kvasac i podesila pH vrednost podloge za narednu fermentaciju a ostatak se provodi kroz isparivač kako bi se dodatno uklonila vlaga (Rausch i sar., 2005). Najnovija istraživanja su pokazala da tečna džibra daje obećavajuće rezultate kao jedna od najnovijih sirovina za dobijanje mlečne kiseline i trenutno se vrše intenzivna ispitivanja u cilju karakterisanja fermentacije i povećanja produktivnosti (Đukić-Vuković i sar., 2011). Sušenjem tečne džibre dobija se proizvod koji predstavlja **kondenzovane rastvorene supstance** iz procesa destilacije (eng. *condensed distillers solubles* ili *CDS*) i sadrži oko 30% suve materije. Ovaj proizvod se može koristiti kao hrana za životinje ili se pak tečna džibra može dodati vlažnoj pogači i osušiti tako da se dobije **suva džibra sa rastvorenim materijama** (SDžSRM) (eng. *dried distillers' grains with solubles* ili *DDGS*) koji sadrži minimalno 88% suve materije, odnosno maksimalno 12% vlage (detaljnije u odeljku 4.5.1).

3.3.2. Mokra prerada zrna kukuruza

Za razliku od postrojenja za proizvodnju etanola postupkom suvog mlevenja u kojima se fermentiše celo samleveno zrno, u procesu mokrog mlevenja se zrna kukuruza razdvajaju na nekoliko frakcija što omogućava proizvodnju više prehrambenih i industrijskih proizvoda uključujući i etanol. Tehnologija mokre prerade kukuruznog zrna, koja se smatra najsloženijom tehnologijom u prehrambenoj industriji, predstavlja integralni proces više sukcesivnih operacija, nakon kojih se zrno razdvaja (separiše) na svoje osnovne konstituente (Drapcho i sar., 2008; Milašinović, 2005). Postupak mokrog mlevenja je uveden pre više od 150 godina, u procesu proizvodnje kukuruznog skroba (Drapcho i sar., 2008). Tehnološki postupak koji se primenjuje pri mokroj preradi kukuruza, odnosno njegovoj preradi na skrobarski način, sastoji se od nekoliko osnovnih faza: močenje zrna, separacija klice, izdvajanje mekinja, izdvajanje glutena, pranje skroba i sušenje skroba (slika 3.8) (Johnson, 1994).



Slika 3.8. Blok šema procesa mokre prerade kukuruza

U procesu mokre prerade, zrno se moči u vodi u kojoj je rastvoren SO₂ gas (voda za močenje). Voda od močenja koja sadrži rastvorene ugljene hidrate i proteine iz zrna se uparava i uvodi u sušnicu zajedno sa hranivom od kukuruznog glutena (slika 3.8). Nakon močenja, zrno se drobi da bi se izdvojila kukuruzna klica. Klica se suši u posebnoj sušnici, a kukuruzno ulje se može ekstrahovati odmah ili naknadno. Mekinje se razdvajaju od skroba i glutena, a potom se gluten izdvaja centrifugiranjem. Nakon pranja, kukuruzni skrob se uvodi u reaktor za likvefakciju. Ostale faze procesa proizvodnje etanola su iste kao i kod suve prerade (Kim i Dale, 2005).

Skrobarskom preradom dobijaju se sledeći primarni proizvodi: skrob, gluten, mekinje, klica i u vodi rastvorljive materije pri močenju zrna - kukuruzni ekstrakt (Radosavljević i Milašinović, 2008). Skrob i kukuruzno ulje predstavljaju najvrednije proizvode mokre prerade kukuruza. Prosečan prinos skroba iznosi 66-68% suve materije (Johnson, 1994). Daljom preradom i mešanjem glutena, mekinja i klica dobijaju se sporedni proizvodi skrobarske prerade kukuruza: mekinje, brašno od kukuruznog glutena, brašno od kukuruzne klice i kondenzovani kukuruzni ekstrakt koji se koriste za ishranu domaćih životinja. Sporedni proizvodi čine trećinu od polazne mase kukuruznog zrna. Važno je napomenuti da se u mokroj skrobarskoj preradi kukuruza ne koristi hemijski ili biološki tretirano zrno (White i sar., 2003), što znači da su proizvodi ovih procesa bezbedni sa stanovišta ishrane, kako ljudi, tako i domaćih životinja. Iako se industrija skrobarske prerade kukuruza u prošlosti razvijala proporcionalno porastu stanovništva, poslednjih godina je doživela nagli razvoj usled povećane potražnje za visokofruktoznim sirupima (zamena za uvozni šećer od šećerne trske) koji se koriste u velikom broju prehrambenih proizvoda i bioetanolom koji povećava oktanski broj bezolovnih goriva, zamenjuje benzin i ne zagađuje vazduh (Johnson, 1994). Povećanjem obima proizvodnje, osim primarnog proizvoda – skroba, raste i količina nusprodukata procesa skrobarske prerade kukuruza.

Primarni proizvod mokre prerade kukuruznog zrna – skrob predstavlja polaznu sirovinu za brojne procese transformacije u daljoj industrijskoj proizvodnji, odnosno višim fazama skrobarske prerade.

Izvanredna nutritivna i funkcionalna svojstva kao što su: sadržaj energije, svarljivost, viskoznost, boja, ukus, kapacitet vezivanja vode i lepljivost, sposobnost bubrenja, želatinizacija i fermentabilnost, čine kukuruzni skrob sirovinom od posebnog značaja za prehrambenu i raznovrsnu široku industrijsku primenu (Milašinović, 2005).

Neke od mogućnosti primene nativnog skroba su na primer: u pekarskim proizvodima, proizvodnji visokofruktoznih sirupa i zaslađivača, slatkiša, žvakaćih guma, hrane za bebe, pudinga, preliava, proizvodnji lepka, briketa, kao vezivna komponenta za voštane boje i krede, boje za papir, u proizvodnji antibiotika i sredstava za dezinfekciju, kozmetike u prahu, proizvodnji sapuna i tako dalje (White i sar., 2003).

Voda od močenja kukuruza je visokoenergetski tečni sastojak hraniva za životinje. Sadrži oko 6-8% suve materije. Ovaj proizvod se ponekad meša sa mekinjama ili se prodaje odvojeno kao tečni izvor proteina za goveda. Takođe se koristi kao vezivo za hranivo u peletima gde istovremeno predstavlja izvor minerala i vitamina B grupe.

Koncentrovani kukuruzni ekstrakt (eng. *corn steep liquor* ili *CSL*) dobija se koncentrisanjem vode od močenja sa rastvorljivim materijama. Sadrži oko 46% proteina, 26% mlečne kiseline, 18% mineralnih materija i 2,5% šećera. Sadrži vitamine, mikroelemente i mlečnu kiselinu. Najčešće se primenjuje u farmaceutskoj industriji za spravljanje hranljivih mikrobioloških podloga u proizvodnji antibiotika. Može se takođe dodati kukuruznim mekinjama pre sušenja, kao proteinski suplement.

Kukuruzne klice se koriste u proizvodnji kukuruznog ulja, ekonomski najvrednije komponente kukuruznog zrna, a od pogače zaostale posle ceđenja i ekstrakcije se proizvodi brašno od kukuruznih klica. Kukuruzna klica sadrži 48% ulja, 13% proteina, 12% skroba, 2% pepela i 3% vlage. **Brašno od kukuruznih klica** sadrži 20% proteina, 2% masti i 9,5% vlakana. Dobija se presovanjem kukuruznih klica do 15% sadržaja ulja, a zatim se ostatak ulja ekstrahuje heksanom. Ima aminokiselinski sastav koji najviše pogoduje ishrani živine i svinja.

Hranivo od kukuruznih mekinja sadrži umerenu količinu proteina (tabela 3.7) a sastoji se od mekinja, kukuruznog ekstrakta i u nekim slučajevima brašna od kukuruznih klica. Najčešće sadrži oko 21% proteina, 2,5% masti i 8% vlakana. Aminokiselinski profil je sličan celom zrnu kukuruza, osim u slučaju kada ne sadrži brašno od kukuruznih klica.

Metabolička energija iznosi 92, 71 i 52% za goveda, svinje i živinu, respektivno, u odnosu na energiju koja se dobija iz kukuruznog zrna (White i sar., 2003). Kukuruzne mekinje koje po svom hemijskom sastavu predstavljaju smešu celuloze i hemiceluloze sa niskim sadržajem skroba i proteina (Milašinović, 2005) predstavljaju dobar izvor energije za preživare koji mogu da metabolišu ova vlakna. Hranivo od kukuruznih mekinja se prodaje u suvom ili vlažnom obliku. Suvo hranivo od kukuruznih mekinja se oblikuje u pelete radi lakšeg rukovanja. Vlažno hranivo od kukuruznih mekinja (45% suve materije) je kvarljivo, ima rok trajanja 6-10 dana ili se mora čuvati u anaerobnim uslovima. Uglavnom se koristi u ishrani goveda.

Brašno od kukuruznog glutena je visokoproteinski koncentrat koji najčešće sadrži 60% proteina, 2,5% masti i 1% vlakana (tabela 3.7). Lako je svarljivo, zbog čega se preporučuje u ishrani pilića. Dobar je izvor ksantofila (244-550 mg/kg, računato na suhu materiju) zbog čega je pogodno za ishranu živine kao izvor žutog pigmenta. Proteini ovog nusprodukta su odličan izvor metionina i cistina ali sadrže malo lizina i triptofana (White i sar., 2003). Brašno od kukuruznog glutena može se kombinovati sa sojinim brašnom, s obzirom da ono sadrži lizin i triptofan a deficitarno je metioninom i cistinom, pa se na taj način nadopunjuje aminokiselinski sastav hraniva.

Postrojenja za vlažnu meljavu se mogu jednostavno prilagoditi i proizvodnji drugih proizvoda kao što su kukuruzni sirupi i visokofruktozni kukuruzni sirupi, koji se mogu proizvoditi nezavisno od etanola. Ovi proizvodi imaju ne samo ekonomski značaj već su i strateški važni, posebno dok nije izražena potreba za etanolom na tržištu (Drapcho i sar., 2008).

U tabeli 3.7. dat je uporedni prikaz sadržaja hranljivih materija u nekim od nusprodukata procesa fermentacije sa suvim mlevenjem, procesa mokrog mlevenja i industije alkoholnih pića (US Grains Council, 2011; Erickson i sar., 2005; National Research Council - NRC, 1998).

Tabela 3.7. Uporedni prikaz sadržaja hranljivih materija (kao osnove hraniva) između SDŽSRM vrhunskog kvaliteta, SDŽSRM preporučenog kvaliteta, hraniva od kukuruznih mekinja, brašna od kukuruznog glutena i suvog pivskog tropa

	Kukuruzna SDŽSRM vrhunskog kvaliteta	Kukuruzna SDŽSRM preporučenog kvaliteta	Hranivo od kukuruznih mekinja	Brašno od kukuruznog glutena	Suvi pivski trop
Suva materija, %	89	93	90	90	2
Ukupni proteini,%	27,2	27,7	21,5	60,2	26,5
Ukupne masti, %	9,5	8,4	3,0	2,9	7,3
ADF,%	14,0	16,3	10,7	4,6	21,9
NDF, %	38,8	34,6	33,3	8,7	48,7
Svarljiva energija (SE), kcal·kg ⁻¹	3953	3200	2990	4225	2100
Metabolička energija (ME), kcal·kg ⁻¹	3580	2820	2605	3830	1960
Arginin, %	1,06	1,13	1,04	1,93	1,53
Histidin, %	0,68	0,69	0,67	1,28	0,53
Izoleucin, %	1,01	1,03	0,66	2,48	1,02
Leucin, %	3,18	2,57	1,96	10,19	2,08
Lizin, %	0,74	0,62	0,63	1,02	1,08
Metionin, %	0,49	0,50	0,35	1,43	0,45
Cistin, %	0,52	0,52	0,46	1,09	0,49
Fenilalanin, %	1,32	1,34	0,76	3,84	1,22
Treonin, %	1,01	0,94	0,74	2,08	0,95
Triptofan, %	0,21	0,25	0,07	0,31	0,26
Valin, %	1,34	1,30	1,01	2,79	1,26
Kalcijum	0,05	0,20	0,22	0,05	0,32
Hlor, %	--	0,08	0,22	0,06	0,15
Magnezijum, %	0,13	0,19	0,33	0,08	0,16
Fosfor, %	0,79	0,77	0,83	0,44	0,56
Iskoristljivi fosfor, %	0,71	0,59	0,49	0,07	0,19
Kalijum, %	0,84	0,84	0,98	0,18	0,08
Natrijum, %	0,22	0,20	0,15	0,02	0,26
Sumpor, %	0,44	0,30	0,22	0,43	0,31
Bakar, mg·kg ⁻¹	6	57	48	26	21
Gvožđe, mg·kg ⁻¹	121	257	460	282	250
Mangan, mg·kg ⁻¹	13	24	24	4	38
Selen, mg·kg ⁻¹	--	0,39	0,27	1,00	0,70
Cink, mg·kg ⁻¹	75	80	70	33	62
β-karoten, mg·kg ⁻¹	--	3,5	1,0	--	0,2
Vitamin E, mg·kg ⁻¹	--	--	8,5	6,7	--
Niacin, mg·kg ⁻¹	--	75	66	55	43
Pantotenska kiselina, mg·kg ⁻¹	--	14,0	17,0	3,5	8,0
Riboflavin, mg·kg ⁻¹	--	8,6	2,4	2,2	1,4
Vitamin B12, mg·kg ⁻¹	--	0,0	0,0	0,0	0,0
Biotin, mg·kg ⁻¹	--	0,78	0,14	0,15	0,24
Holin, mg·kg ⁻¹	--	2637	1518	330	1723
Folna kiselina, mg·kg ⁻¹	--	0,90	0,28	0,13	7,10
Tiamin, mg·kg ⁻¹	--	2,9	2,0	0,3	0,6
Vitamin B6, mg·kg ⁻¹	--	8,0	13,0	6,9	0,7

Suvi pivski trop je sporedni proizvod industrije piva i sastoji se od ostatka ječmenog slada i nesladovanih sirovina, ako se koriste u pripremi sladovine. Visoki sadržaj vlakana (18-19%) ograničava upotrebu pivskog tropa u ishrani nekih životinja (U.S. Grains Council, 2011).

Sporedni proizvodi suvog mlevenja, mokrog mlevenja i industrije alkoholnih pića međusobno se razlikuju po sadržaju hranljivih materija i imaju drugačiju ekonomsku vrednost u određenim vrstama hrane za životinje.

Osnovne nutritivne prednosti kvalitetne suve džibre sa rastvorenim materijama u poređenju sa hranivom od kukuruznog glutena, brašnom od kukuruznog glutena i suvim pivskim tropom jesu visoki sadržaj ulja i iskoristljivog fosfora. Vrednosti svarljive (SE) i metaboličke energije (ME) kvalitetne suve džibre sa rastvorenim materijama znatno su više od energija hraniva od kukuruznog glutena i suvog pivskog tropa, ali ipak niže od energija brašna od kukuruznog glutena. Sadržaj amino kiselina suve džibre niži je nego kod brašna od kukuruznog glutena, ali je uporediv sa hranivom od kukuruznog glutena i suvim pivskim tropom.

Kombinovanjem nekoliko studija (Paul, 1980; Gulati i sar., 1996; Ladisch i Dyck, 2005; McAllon i sar., 2000). Kim i Dale (2005) su izračunali ukupnu potrošnju energije u procesima suve i mokre prerade kukuruza u proizvodnji bioetanola. Procentualni udeli potrošnje energije u pojedinim fazama ovih procesa prikazani su u tabeli 3.8.

Tabela 3.8. Procentualni udeo energije potreban za pojedine faze procesa suve i mokre prerade zrna kukuruza

Faza procesa	Udeo energije, %
<i>Suva prerada kukuruza</i>	
Mlevenje	0,8
Likvefakcija/saharifikacija	29,7
Fermentacija	3,5
Destilacija	56,5
Izdvajanje SDSR	9,6
<u>Ukupno</u>	100,0
<i>Mokra prerada kukuruza</i>	
Močenje	9,6
Otklicavanje	0,4
Izdvajanje glutenskog hraniva	3,4
Idvajanje glutenskog brašna	3,6
Pranje skroba	3,3
Likvefakcija/saharifikacija	9,3
Fermentacija	5,3
Destilacija	46,0
Sušenje klice	2,3
Ekstrakcija rastvaračem	1,0
Sušenje glutenskog brašna	2,4
Sušenje glutenskog hraniva	13,2
<u>Ukupno</u>	100,0

Iz tabele se može videti da se najviše energije troši u fazi destilacije kod oba procesa, dok su utrošci energije izdvajanja nusprodukata znatno manji. Potrošnja energije za proizvodnju 1 kg bioetanola iznosi između 13,7 i 17,6 MJ kod suve prerade, i 12,4 do 23,4 MJ kod mokre prerade (Shapouri i sar., 1995; Shapouri i sar., 2002; Wang, 2000; Graboski, 2002).

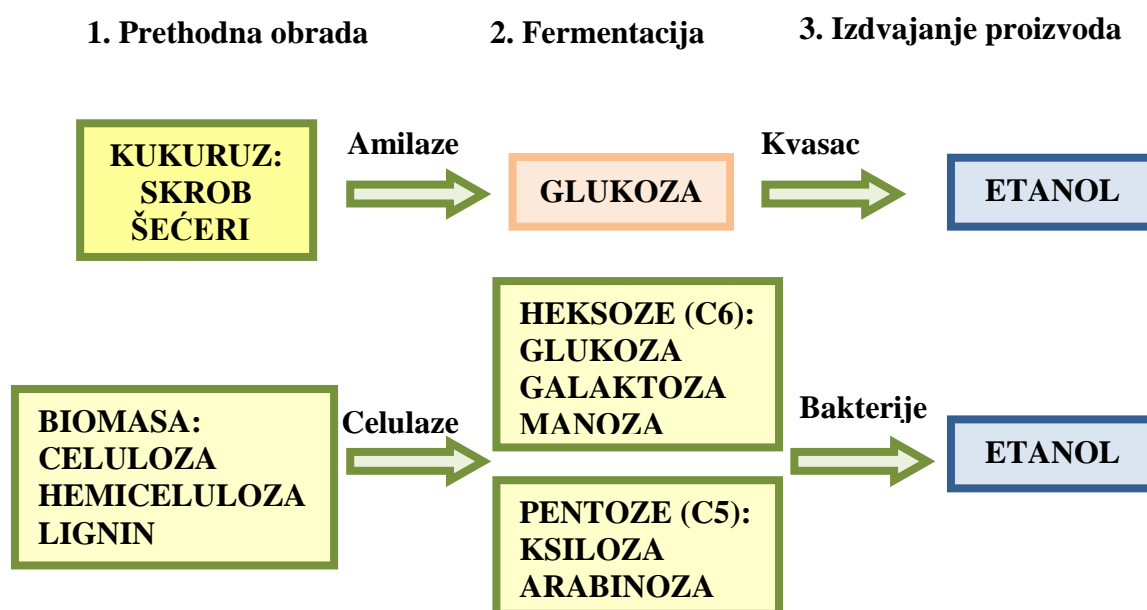
Sa ekološkog stanovišta, proces mokre skrobarske prerade kukuruza negativno utiče na životnu sredinu zbog velike potrošnje sumporaste kiseline (rastvor sumpor-dioksida u vodi) u toku faze močenja kukuruza. Ceo proces mokre prerade uključujući i faze separacije skroba i nusprodukata iziskuje dosta vremena i velike utroške energije (Ramirez i sar., 2009). Prema izveštaju Agencije za zaštitu životne sredine SAD (EPA, 2000), sumpor-dioksid je jedan od najčešćih zagađivača vazduha u SAD. Sumpor-dioksid iz atmosfere dovodi se u vezu sa hroničnim oboljenjima organa za disanje. U visokim koncentracijama utiče na ljude obolele od astme (Boushey, 1982). Takođe, oksidacijom SO₂ u prisustvu drugih gasova kao što je azot-dioksid (NO₂), gradi se sumporna kiselina koja je uzročnik kiselih kiša. Međutim, novim, enzimskim dvostepenim procesom mokre skrobarske prerade kukuruza koncentracija SO₂ potrebnog za močenje kukuruza bi se mogla smanjiti do minimalnih koncentracija koje su neophodne da bi se sprečio rast mikroorganizama a vreme močenja skratilo 6 puta, (sa 36 na 6 sati) (Ramirez i sar., 2009). Proces enzimske mokre prerade je trenutno samo za nijansu ekonomičniji od klasičnog procesa zahvaljujući trenutno relativno visokim cenama kukuruza i enzimskih preparata. Predviđa se da će u budućnosti, razvojem tehnologije i sniženjem cena enzimskih preparata ovaj postupak biti znatno isplativiji. Detaljnija ekonomska analiza isplativosti primene sporednih proizvoda dobijanja etanola procesom mokre prerade kukuruznog zrna do sada nije vršena te stoga predstavlja zanimljivu temu za buduća istraživanja.

4. TEHNOLOGIJE PROIZVODNJE BIOETANOLA

4.1. Osnovne faze proizvodnje bioetanola

Proizvodnja bioetanola se zasniva na procesu fermentacije šećera prisutnih u biomasi ili prethodno dobijenih enzimskom konverzijom sastojaka biomase. U procesu fermentacije šećera učestvuju mikroorganizami, najčešće kvasaci ili bakterije. Proizvodne tehnologije se razlikuje u zavisnosti od sirovine, a u opštem slučaju se mogu podeliti u tri faze (slika 4.1):

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



Slika 4.1. Uprošćena blok-šema dobijanja etanola iz biomase

4.2. Priprema skrobnih sirovina za alkoholnu fermentaciju

Pre početka procesa fermentacije skrobne sirovine među kojima su najzastupljenije žitarice (kukuruz, pšenica, raž, tritikale itd) i krompir moraju se prethodno podvrgnuti postupku hidrolize do fermentabilnih šećera koje kvasac može da previre.

4.2.1. Hidroliza kukuruznog skroba

Kukuruz je najzastupljenija skrobna sirovina u proizvodnji etanola, naročito u SAD (Drapcho i sar., 2008). Procesna tehnologija koja je razvijena za kukuruz može se jednostavno adaptirati na druge žitarice. Postrojenja za dobijanje etanola iz kukuruza zahtevaju neznatne modifikacije kako bi se prilagodile drugim žitaricama. Iz kukuruza se etanol dobija primenom suvog ili mokrog mlevenja. Ključni koraci ovih procesa su prikazani na slikama 3.6. i 3.7. (poglavlje 3.3). Glavna razlika između ova dva procesa je u tome što se u procesu suvog mlevenja celo zrno melje i uvodi u fermentor, dok se kod mokre meljave komponente zrna prvo razdvoje na frakcije, a zatim se samo skrobna frakcija koristi u fermentaciji. Iz tog razloga proces mokre meljave zahteva mnogo veće kapitalne investicije, a postrojenja za proizvodnju etanola su mnogo veća od onih koja primenjuju proces suve meljave.

Kukuruzno zrno sadrži više od 70% ugljenih hidrata, od čega najveći deo čini skrob a celuloza i hemiceluloza oko 10%. Prva i veoma značajna faza u tehnološkom postupku proizvodnje bioetanola je hidroliza kukuruznog skroba (Mojović i sar., 2007). Hidroliza skroba do glukoze može se prikazati sledećom jednačinom:



Gde n predstavlja broj glukoznih ostataka u molekulu skroba. Količina glukoze koja se dobija od 1 kg skroba je $180n/(162n + 18)$. Kada je $n=2$, kao kod maltoze, faktor konverzije je 1,053. Kada n postane jako veliko, ovaj faktor se približava 1,111.

Osnovni cilj hidrolize jeste da se polimerne komponente skroba, amiloza i amilopektin, što efikasnije razgrade do prostijih šećera koji se mogu fermentisati

pomoću kvasaca ili bakterija. Postoje tri osnovna tipa hidrolize koji se mogu primenjivati: 1) kiselinski, 2) kiselinsko-enzimski i 3) dvojno-enzimski.

1) **Kiselinska hidroliza** je postupak koji se sve manje primenjuje zbog velikih utrošaka energije, stvaranja sporednih proizvoda i otežane kontrole procesa. Izvodi se pomoću sumporne ili hlorovodonične kiseline uz zagrevanje skrobne suspenzije koja sadrži 30-40% suve materije, na temperaturi 100-148°C i pH vrednosti 1,5-2. Dejstvom kiselina se može postići delimična ili potpuna hidroliza. Proizvodi delimične hidrolize su sirupi i hidrolizati skroba, a potpunom hidrolizom nastaje glukoza. Iako nastali hidrolizati pokazuju dobre filtracione karakteristike, kao sporedni proizvodi nastaju polimeri koji boje rastvor i visok sadržaj pepela. Zbog toga postupci prečišćavanja dodatno poskupljuju proces. Zbog nespecifičnog dejstva kiselina nastaje i sporedni proizvod oksimetilfurfurol koji se zbog nepostojanosti dalje razlaže na mravlju i levulinsku kiselinu. Osim sporenih proizvoda koji smanjuju prinos željenog produkta, dodatna faza prečišćavanja i veliki troškovi usled izvođenja hidrolize na visokoj temperaturi i visokom pritiskom doveli su do prelaska na enzimski postupak hidrolize (Baras i Šušić, 1982).

2) **Kiselinsko-enzimskom hidrolizom** se skrob na povišenoj temperaturi i pod pritiskom u prisustvu kiseline kao katalizatora prevodi u rastvor. Mehaničko i kiselinsko utečnjavanje skrobne suspenzije sa 30-40% suve materije vrši se tokom 5 minuta na temperaturi od 140°C i kiselinom podešenoj vrednosti pH u intervalu 2-5. Suviše niske vrednosti pH izazivaju promenu obojenja i formiranje sporednih proizvoda, a suviše visoke vrednosti pH utiču na nepotpuno utečnjavanje skroba. Potom se smeša hladi do 95°C, pH podesi na 6-6,5 i dodaju enzimi, čime započinje faza saharifikacije. Saharifikacija se odvija u fermentorima u kojima se vrši višečasovna hidroliza oligosaharida dobijenih u fazi likvefakcije, na odgovarajućoj temperaturi. Glavna prednost ovog kombinovanog postupka je u tome što se dobijeni proizvodi lako filtriraju a primenjuje se manja količina enzima. Međutim, zbog primene kiselina, formiraju se sporedni proizvodi koji smanjuju kvalitet i prinos glukoze (Baras i Šušić, 1982).

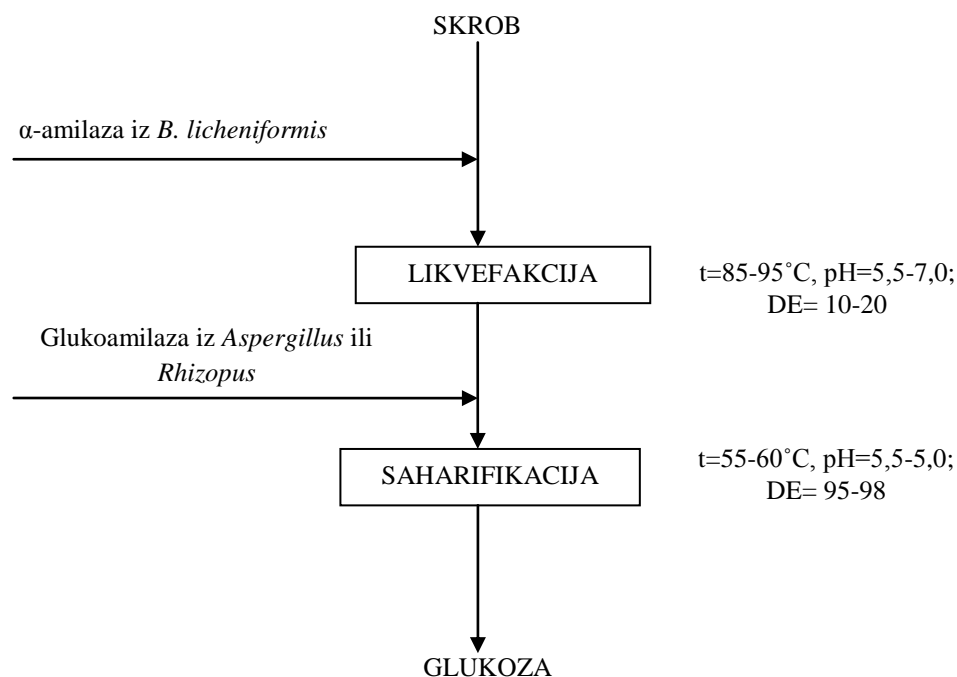
4.2.1.1. Dvojno-enzimski postupak hidrolize skroba

Dvojno-enzimski postupak hidrolize skroba je savremeno rešenje u kome se koriste termostabilne amilaze koje omogućavaju hidrolizu na nižoj temperaturi i pritisku (Nikolić, 2009). Osnovne prednosti ovakvog postupka su manja potrošnja energije i niži prinos neglukozidnih nečistoća.

Utečnjavanje ili likvefakcija skroba je prva faza dvojno-enzimske hidrolize skroba u kojoj dolazi do delimične hidrolize skroba uz smanjenje viskoznosti suspenzije. U ovoj fazi se koristi enzim termostabilna α -amilaza koja vrši utečnjavanje skroba tako što hidrolizuje unutrašnje α -D-(1-4)-glikozidne veze. Faza likvefakcije obuhvata: intenzivno mešanje polazne skrobne suspenzije, podešavanje optimalne pH vrednosti koja je odgovarajuća za dati enzim i zagrevanje smeše na temperaturu neophodnu za likvefakciju (85-110°C) u toku 1-1,5 h. Na povišenoj temperaturi granule skroba bubre i želatinizuju se. Bubljenje i hidratacija granula skroba izazivaju znatan porast viskoziteta kaše i gubitak kristalinične strukture granula. Nastaje gusta kaša koja dejstvom enzima po završetku likvefakcije prelazi u tečnu smešu dekstrina (kompleksnih šećera). Cilj likvefakcije je da se smanji viskoznost suspenzije, kao i dovođenje dekstroznog ekvivalenta do vrednosti između 10 i 20 u zavisnosti od količine dodatog enzima (dekstrozni ekvivalent DE predstavlja odnos redukujućih šećera izraženih kao glukoza i ukupnih ugljenih hidrata računato na suhu materiju). Na brzinu likvefakcije utiče više faktora kao što su: temperatura, brzina mešanja, pH vrednost, vreme trajanja likvefakcije, koncentracija supstrata, koncentracija enzima, dodatak Ca^{2+} jona itd (Mojović i sar., 2006).

Ošecerenje ili saharifikacija skroba je druga faza hidrolize skroba. U ovoj fazi se koristi enzim glukoamilaza koji vrši dalju razgradnju skroba tako što hidrolizuje α -D-(1-4) i α -D-(1-6)-glikozidne veze počevši od neredukujućeg kraja makromolekula, što dovodi do stvaranja glukoze kao krajnjeg proizvoda (Kendereški, 1986). Saharifikacija skroba obuhvata: hlađenje smeše do optimalne temperature za glukoamilazu, podešavanje optimalne pH vrednosti, dodavanje odgovarajuće količine enzima uz konstantno mešanje sve dok se saharifikacija ne završi, što se utvrđuje merenjem sadržaja redukujućih šećera odnosno određivanjem DE vrednosti (na kraju hidrolize DE iznosi 97-98). Faktori koji utiču na efikasno odvijanje faze likvefakcije utiču takođe i na fazu saharifikacije.

Ukoliko je pri kraju hidrolize koncentracija redukujućih šećera veoma visoka, glukoamilaza može izvršiti polimerizaciju glukoze. Pritom, najčešće nastaju izooblici di- i tri- saharidi (izomaltoza i izomaltotrioza) zbog čega se smanjuje kvalitet i prinos željenog proizvoda (Milijanović, 2005). Uprošćena šema hidrolize skroba pomoću α -amilaze i glukoamilaze prikazana je na slici 4.2.



Slika 4.2. Šema dvojno-enzimske hidrolize skroba (Van der Veen i sar., 2006)

4.2.1.2. Enzimi koji katalizuju hidrolizu skroba

Enzimi koji katalizuju delimičnu ili potpunu hidrolizu skroba do glukoze i oligosaharida manje molekulske mase nazivaju se **amilaze** (Knežević-Jugović, 2008). Amilaze (amilolitički enzimi) su grupa hidrolaza koje su veoma zastupljene u mikroorganizmima, biljkama i životinjama. Ovi enzimi katalizuju hidrolizu skroba i prema načinu delovanja mogu se podeliti u tri grupe: endoamilaze, egzoamilaze i enzimi koji otkidaju grane molekula.

Endoamilaze hidrolizuju α -(1-4)-glikozidne veze u unutrašnjosti molekula skroba nasumično, što dovodi do naglog smanjenja molekulske mase skroba. Kada naiđu na tačku grananja, tj. na α -(1-6)-glikozidnu vezu hidroliza se prekida. U ovu grupu amilaza spadaju **α -amilaze** (EC 3.2.1.1) koje proizvode glikozidne lance različite dužine. Njihovo sistemsko ime je α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaza. Pod dejstvom α -amilaze nastaju dekstrini sa α -konformacijom na prvom C-atomu, odakle i potiče naziv

α -amilaze. Mikroorganizmi koji metabolizmom stvaraju α -amilaze su plesni, kvasci, bakterije i aktinomicete, mada se uglavnom u njihovom industrijskom dobijanju koriste plesni (*Aspergillus oryzae*) i bakterije (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*). Prva korišćena α -amilaza bila je amilaza iz *B. amyloliquefaciens*. Kompanija „Novozymes“ je proizvela termostabilne α -amilaze dobijene iz *B. licheniformis* pod komercijalnim nazivom Termamyl 120 L ili Termamyl SC. Amilaze iz većine bakterija i plesni imaju pH optimum u kiselom i neutralnom opsegu (5-7). Optimalna radna temperatura 65-70°C, dok su α -amilaze iz sojeva *B. licheniformis* stabilne i na 90°C. α -amilaze su metaloenzimi, koje u svom sastavu sadrže jone kalcijuma (Ca^{2+}) kao kofaktore od esencijalnog značaja za njihovu aktivnost. Broj ovih jona varira u zavisnosti od porekla enzima i kreće se od 1 do 10, iako je kod većine dovoljan samo jedan jon kalcijuma da bi enzim bio aktivan i stabilan. Prisustvo Ca^{2+} jona povećava termostabilnost α -amilaze a preporučene količine ovih jona su 40-60 ppm. Određeni broj jona Ca^{2+} može se lako ukloniti dijalizom ili dodavanjem agenasa koji vezuju metale, kao što je EDTA (etilen-diamin-tetraacetat), ali takav enzim postaje manje aktivan i stabilan (Knežević-Jugović, 2008).

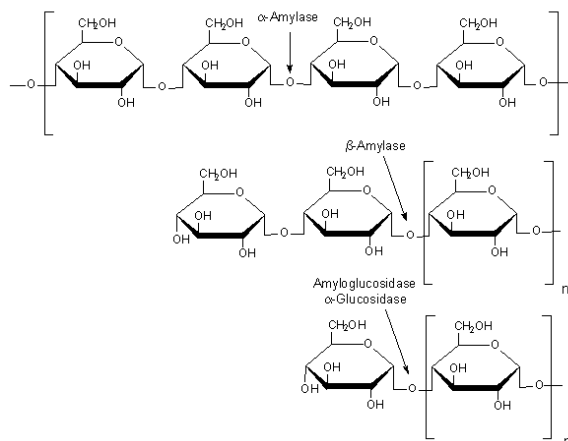
Egzoamilaze, u koje spadaju **β -amilaze i glukoamilaze**, raskidaju α -D-(1-4)-glikozidne veze postepeno počevši od neredukujućeg (Knežević-Jugović, 2008).

Sistematsko ime β -amilaza je α -1,4-glukan-4-maltohidrolaza sa enzimskim brojem EC 3.2.1.2. Pošto β -amilaze raskidaju svaku drugu vezu, odnosno otkidaju po dve glukozne jedinice, maltoza je osnovni proizvod koji se dobija pri dejstvu ovog enzima. Pri otkidanju jednog molekula maltoze dolazi do tzv. Valdenove (Walden) inverzije na prvom C atomu pa se dobija maltoza β -konformacije. Ova konfiguraciona promena koja nastaje na produktu enzimske hidrolize je razlog što se ovi enzimi nazivaju β -amilazama, pa njihovo ime ne treba vezivati sa mogućnošću raskidanja β -glikozidne veze i mešati ih sa celulazama (Knežević-Jugović, 2008). Kao i α -amilaze, ni β -amilaze ne raskidaju α -D-(1-6)-glikozidne veze i nemaju mogućnost da ih zaobiđu. Kada se približe mestu grananja, hidroliza se prekida i dobijaju se granični dekstrini. Zbog toga se prilikom dvojno-enzimske hidrolize skroba, kako bi se kao krajnji proizvod dobila glukoza koristiti, kao što je već napomenuto, isključivo α -amilaza.

Glukoamilaze (poznate i kao amiloglukozidaze, α -glukozidaze) raskidaju redom glikozidne veze otkidajući po jednu glukoznu jedinicu počevši od neredukujućeg kraja molekula, pa kao osnovni proizvod hidrolize nastaje glukoza. Sistematsko ime ovog enzima je α -1,4-glukan-4-glukohidrolaza sa enzimskim brojem EC 3.2.1.3. Pored α -D-(1-4)-glikozidne veze, ove amilaze raskidaju α -D-(1-6) i α -D-(1-3)-glikozidne veze. Afinitet ovog enzima prema svim vezama koje raskida nije isti, tako da, iako enzim teoretski može da katalizuje hidrolizu skroba do glukoze sa 100% prinosa, to ipak nije slučaj u praksi. Zbog toga je potrebno da pored glukoamilaze bude prisutna i α -amilaza kako bi se skrob u potpunosti razgradio. Temperaturni optimum je 50-60°C, dok se povišenjem temperature drastično smanjuje aktivnost, a već na 85°C se u roku od 5 minuta inaktivira. Optimalna pH vrednost je između 4 i 5. Mnoge vrste plesni sposobne su da proizvedu glukoamilazu pod različitim uslovima pri čemu se industrijska proizvodnja fokusira na proizvodnji iz *Aspergillus niger* i *Rhizopus oryzae*. Najpoznatiji komercijalni nazivi su (proizvođač Novozymes, Danska): SAN Extra L (iz *Aspergillus niger*), Spirizyme Plus FG i AMG 300L.

Enzimi koji otkidaju grane molekula imaju značajnu ulogu u biosintezi i razgradnji skroba u biljkama (Medić, 2011). U biljkama postoje dve klase ovih enzima: pululanaze (poznate i kao R-enzim ili granične dekstrinaze; EC 3.2.1.41) i izoamilaze (EC 3.2.1.68). Pululanaza raskida α -(1-6) veze pululana i amilopektina, ali slabo deluje na glikogen. Izoamilaza uspešno raskida α -(1-6) veze amilopektina i glikogena, ali ne i pululana. Glavna funkcija pululanaze je hidroliza α -(1-6) veza u molekulima skroba prokljalog semena, kao i u razvoju zrna pirinča i kukuruza, što ukazuje na to da takođe ima ulogu u sintezi skroba. Za razliku od njih, izoamilaza ima presudnu ulogu u sintezi skroba. Tokom klijanja, endogene amilaze hidrolizuju skrobne granule čime nastaju šećeri kao što su glukoza i maltoza. Ovi šećeri se potom koriste kao izvori energije i glukoze u sadnicama.

Na slici 4.3. je prikazan način delovanja enzima α -amilaze, β -amilaze i glukoamilaze na molekule skroba.



Slika 4.3. Specifično delovnje pojedinih amilaza na raskidanje veza u molekulu skroba

Iako enzimi pružaju mnogobrojne prednosti u odnosu na klasične hemijske katalizatore, visoke cene većine enzimskih preparata otežavaju širu industrijsku primenu enzimskih postupaka. I pored toga što specifičnost katalitičkog dejstva enzima znatno pojednostavljuje i pojeftinjuje fazu prečišćavanja krajnjeg proizvoda, visoka cena samog enzima je često faktor koji određuje rentabilnost kompletnog procesa. Pri korišćenju nativnih enzima, katalitičke reakcije se najčešće izvode dodavanjem enzima u rastvor reaktanata. Ovakav postupak stvara niz poteškoća jer po završenoj reakciji, enzim ostaje ili kao kontaminirajuća primesa u finalnom proizvodu ili se odstranjuje takvim metodama koje u većini slučajeva uništavaju njegovu aktivnost. Enzimi se u ovom slučaju koriste samo jedanput i potom gube vrednost, što značajno povećava cenu postupka (Knežević-Jugović, 2008).

U cilju ostvarivanja bolje ekonomičnosti i višestrukog korišćenja, razvijene su i patentirane različite tehnike imobilizacije enzima. Po definiciji, imobilisani enzimi su enzimi koji su fizički lokalizovani ili hemijski vezani u određenom prostoru, pri čemu zadržavaju katalitičku aktivnost. Prema tome, imobilizacija enzima predstavlja uključivanje enzima u bilo koju izolovanu fazu, koja je odvojena od faze slobodnog rastvora, pri čemu molekuli supstrata i proizvoda reakcije mogu da se razmenjuju između faza (Knežević-Jugović, 2008). Imobilizacijom se može povećati čistoća finalnog proizvoda i smanjiti potrošnju samog enzima, kao i ukupni troškovi proizvodnje bioetanola.

4.3. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Faza koja sledi nakon pripreme supstrata jeste fermentacija šećera. Ona se najčešće izvodi pomoću kvasaca iz roda *Saccharomyces cerevisiae* na temperaturi od oko 30°C, mada se mogu koristiti i drugi sojevi kvasaca (*Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* i *Klyveromyces*) i bakterija (*Zymomonas mobilis*, *Clostridium sporogenes* i *Thermoanaerobacter ethanolicus*).

Za odvijanje procesa alkoholne fermentacije koriste se specijalno konstruisani sudovi – fermentori. Reakcija se najčešće odvija u anaerobnim uslovima, iako su kvasci fakultativni anaerobi (mogu da fermentišu šećere u prisustvu ili u odsustvu vazduha). Alkoholna fermentacija u kojoj dolazi do biohemijske transformacije ugljenih hidrata, prvenstveno monosaharida glukoze, u etanol i ugljen-dioksid, pod anaerobnim uslovima, uz oslobađanje energije koju je potrebno izdvojiti iz sistema, može se izraziti Gej-Lisakovom (Gay-Lussac) jednačinom:



To znači da se od 1 kg glukoze teorijski može dobiti 0,51 kg etanola i 0,49 kg ugljen-dioksida. U realnom slučaju prinos alkohola i ugljen-dioksida je nešto manji i zavisi od više faktora kao što su: vrsta šećera koji se fermentiše, korišćeni proizvodni mikroorganizam i primenjeni procesni uslovi. U dobro koncipiranim postupcima stvarni prinos se kreće oko 90-95% od teorijskog prinosa (Mojović i sar., 2007).

4.3.1. Faktori koji utiču na tok i efikasnost alkoholne fermentacije

Na odvijanje i efikasnost procesa fermentacije utiču brojni faktori kao što su: aeracija, temperatura, pH, sastav supstrata, mešanje, koncentracija nutrijenata potrebnih za metabolizam proizvodnog mikroorganizma, prisustvo inhibitora u podlozi, kontaminacija hranljive podloge drugim mikroorganizmima kao i karakteristike samog proizvodnog mikroorganizma (Stojaković, 2001).

Aeracija hranljive podloge vazduhom tokom prva 2-3 h je neophodna da bi se obezbedio kiseonik koji je potreban za rast i umnožavanje ćelija kvasca. I pored toga što je proizvodnja etanola anaeroban proces, kiseonik je neophodan za sintezu sterola i

nezasićenih masnih kiselina koji su značajni za strukturu i funkcionisanje citoplazmatične membrane ćelija kvasca. Za različite sojeve kvasca potrebna je različita količina kiseonika. Kada se sav kiseonik iz podloge potroši, sadržaj sterola u ćelijama i brzina apsorpcije nutrijenata počinje da opada i kvasac menja svoju metaboličku aktivnost. S obzirom na direktnu vezu između sinteze sterola i rasta kvasca, količina sterola koja se nalazi unutar populacije kvasca određuje brzinu i stepen fermentacije (Stojaković, 2001; Stojanović i Nikšić, 2000; Veličković, 2000).

Temperatura na kojoj se izvodi alkoholna fermentacija utiče na respiracionu i fermentacionu aktivnost kvasca. Na optimalnu temperaturu utiče veliki broj faktora i zbog toga nije precizno definisana, ali se može reći da se nalazi u opsegu od 25-30°C. To je temperatura koja istovremeno obezbeđuje brzu fermentaciju pri kojoj se ne ometa razmnožavanje kvasca uz postizanje što potpunije transformacije šećera u etanol i ugljen-dioksid. Na višim temperaturama fermentacija je brža i intenzivnija, ali nastaje i veća količina sporednih metabolita što otežava kasniju izolaciju etanola. Na višim temperaturama kvasci su osetljivi na etanol (sa povećanjem temperature za svakih 10°C povećava se smrtnost ćelija kvasca od etanola 10 puta). Na nižim temperaturama fermentacija šećera je potpunija i može se ostvariti veći prinos etanola. Temperature više od 34°C na kojima kvasac gubi moć fermentacije su kritične temperature (Mojević i sar., 2007; Stojaković, 2001; Stojanović i Nikšić, 2000).

pH vrednost supstrata značajno utiče na tok alkoholne fermentacije. Optimalne pH vrednosti se kreću u opsegu od 4 do 6. Vrednosti pH niže od 2,6 značajno ometaju fermentaciju, dok se na većim pH vrednostima formiraju veće koncentracije glicerina i organskih kiselina na račun etanola (Stojaković, 2001; Stojanović i Nikšić, 2000).

Sastav supstrata direktno utiče na fiziološka svojstva kvasca od kojih zavisi dinamika procesa fermentacije i kvalitet gotovog proizvoda. Najvažnija funkcija supstrata je da obezbedi najpogodnije hranljive materije za rast i fermentacionu aktivnost izabranog proizvodnog mikroorganizma. Supstrat mora da sadrži neophodnu koncentraciju fermentabilnih šećera, odnosno izvore ugljenika i asimilativnog azota, faktora rasta i potrebne mineralne materije. Optimalna koncentracija fermentabilnih šećera za odvijanje alkoholne fermentacije kreće se od 15 do 18%, a fermentacija se nesmetano može odvijati sve dok je koncentracija ovih šećera niža od 25%.

Radi racionalnije proizvodnje etanola, potrebno je da u komini od kukuruznog skroba bude što veća koncentracija fermentabilnih šećera. Međutim, koncentrovane komine sporije fermentišu zbog delovanja nepovoljnih faktora: povećana gustina, slabiji prenos mase i toplote, povećana koncentracija alkohola koja deluje inhibitoryno, veći pritisak i veća koncentracija ugljen-dioksida. Da bi se navedeni problemi ublažili, povećava se količina starter kulture, revitalizuje se kvasac pre zasejavanja, dodaju se protektori osmoze itd. Za očuvanje vitalnosti kvasca preporučuje se da se kvasac recirkuliše ili da se pre zasejavanja revitalizuje. Da bi se umanjilo nepovoljno delovanje visokog osmotskog pritiska i povećane koncentracije alkohola, vršena su ispitivanja mogućnosti zaštite vitalnosti kvasca dodatkom pojedinih protekturnih supstanci. Utvrđeno je da glicin, prolin i glicin-betain značajno umanjuju osmotski šok kod kvasca i ubrzavaju asimilaciju glukoze.

U toku alkoholne fermentacije, zahtevi za azotnim nutrijentima se obezbeđuju aminokiselinama i peptidima male molekulske mase (Stojaković, 2001; Stojanović i Nikšić, 2000; Veličković, 2000). Dodatak mineralnih soli i vitamina pozitivno utiče na rast i vijabilnost ćelija kvasca i povećava efikasnost alkoholne fermentacije (Alfenore i sar., 2002). Količina ovih mikronutrijenata koje je potrebno dodati supstratu zavise od sirovine koja se koristi za proizvodnju etanola. Ćelije kvasca za svoj rast zahtevaju vitamine: mezoinozitol, pantotensku kiselinu, biotin, tiamin, nikotinsku kiselinu i piridoksin. Pantotenska kiselina je deo acetyl-CoA koji učestvuje u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i proteina, povećava tolerantnost kvasca na etanol jer stimuliše sintezu lipida. Biotin predstavlja kofaktor mnogih enzima koji učestvuju u reakcijama karboksilacije, a učestvuje i u sintezi nukleinskih kiselina, proteina i masnih kiselina (Alfenore i sar., 2002). Mezoinozitol doprinosi povećanju vijabilnosti ćelija i tolerantnosti kvasca na etanol. Zahteve za piridoksinom i tiaminom imaju samo kvasci gornjeg vrenja (tiamin je uključen u reakcije dekarboksilacije) (Stojaković, 2001). Nikotinska kiselina se koristi za sintezu NAD^+ i NADP^+ (Veličković, 2000).

Za aktivnost kvasca su takođe neophodni izvori Zn, Mn, Mg, Ca, Cu, K, Fe, S i P. Mineralne soli učestvuju u metabolizmu kvasca kao aktivatori enzima ili kao delovi aktivnog centra enzima (Nikolić i sar., 2009.a). Joni metala (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} i Zn^{2+}) utiču na promenu brzine glikolize i konverzije piruvata do etanola i samim tim utiču i na efikasnost alkoholne fermentacije (Stojaković, 2001).

Magnezijum je uključen u mnoge fiziološke funkcije kao što su rast i razmnožavanje kvasca i enzimska aktivnost, a takođe ima značajnu ulogu u zaštiti kvasca od toksičnih količina etanola i visokih temperatura. Ukoliko supstrat ne sadrži dovoljne količine magnezijuma, može doći do spore ili nekompletne fermentacije (Birch i Walker, 2000). Cink utiče na aktivnost enzima kao što su alkoholdehidrogenaza, aldolaze, alkalna fosfataza, DNK i RNK polimeraza (Mayalagu i sar., 1997). Fermentacija se značajno usporava padom koncentracije cinka ispod $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentracija cinka iznad $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ usporava rast kvasca pod uslovom da koncentracija jona Mg^{2+} nije isto toliko visoka (Stojaković, 2001). Bakar utiče na aktivnost enzima α -amilaze i povećava efikasnost enzimske hidrolize (Sodhi i sar., 2005). Međutim, posebna pažnja se obraća na količine dodatog bakra- pri koncentracijama oko $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bakar poboljšava prinos etanola, a pri visokim koncentracijama toksično deluje na vijabilnost kvasca. Joni kalcijuma takođe utiču na povećanje efikasnosti konverzije skrobnih sirovina do etanola (Pejin i Razmovski, 1992). U ćeliji kvasca kalijum utiče na permeabilnost ćelijskog zida, a gvožđe ima posebnu ulogu u citohromima. Utvrđeno je da prisustvo pojedinih jona u određenim koncentracijama može negativno uticati na rast i aktivnost kvasca. Tako na primer, srebro, kadmijum, živa i paladijum inhibiraju rast kvasca u koncentracijama od $1-10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, a litijum, berilijum, nikel, arsen, telur, bor i bakar u koncentracijama preko $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ i selen u koncentraciji od $500-600 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Stojaković, 2001).

Mikrobiološka kontaminacija, izazvana bakterijama mlečno-kiselinskog i sirćetnog vrenja koja dovodi do smanjenog prinosa etanola tokom fermentacije, predstavlja značajan problem koji se može javiti tokom proizvodnje etanola. Većina kontaminanata među bakterijama mlečno-kiselinskog vrenja pripada rodu *Lactobacillus*, a to su najčešće vrste *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum* i *L. paracasei*. Pored bakterija mlečno-kiselinskog vrenja, nepovoljne su i bakterije sirćetnog vrenja, kao što su *Acetobacter aceti*, *A. xylinum* i *A. pasterianus* koje vrše oksidaciju alkohola. Kao mikrobiološka kontaminacija mogu se javiti i bakterije buterne kiseline *Clostridium acetobutylicum* (Graves i sar., 2006).

Postoje dva načina na koji kontaminanti (bakterije) negativno utiču na kvasac. Prvi način je taj što su mlečna i sirćetna kiselina (u svom nedisosovanom obliku) kao krajnji proizvodi metabolizma ovih bakterija u stanju da inhibiraju rast kvasca, tako što difunduju u ćeliju kvasca kroz citoplazmatsku membranu jer su rastvorne u njenim fosfolipidima.

Zatim, ove kiseline disosuju ako je pH vrednost unutar ćelije veća od pH vrednosti van ćelije, što rezultira acidifikacijom citoplazme. Sam mehanizam dejstva mlečne kiseline na ćeliju kvasca još uvek nije objašnjen. Drugi način negativnog uticaja ovih bakterija je da predstavljaju konkurenciju kvascima u pogledu nutrijenata. Gram-pozitivne bakterije mlečne kiseline mogu tolerisati visoke temperature i niske pH vrednosti, i mogu da prežive i rastu veoma brzo (brže se razmnožavaju od kvasaca) pod uslovima u kojima se proizvodi etanol (Bayrock i Ingledew, 2004).

Jedan od načina kontrole bakterijske kontaminacije u industriji etanola je korišćenje antibiotika kao što je penicilin G, streptomycin, tetraciklin, virginiamicin i mononezin. Međutim, neodgovarajuće korišćenje antibiotika može dovesti do obrazovanja sojeva pojedinih bakterija koje pokazuju rezistentnost na određene antibiotike. Drugi način kontrole bakterijske kontaminacije je korišćenje povećanog inokuluma kvasca, čime se postiže inhibicija bakterija što rezultira u smanjenoj produkciji mlečne kiseline i povećanoj krajnjoj koncentraciji etanola. Standardna preporuka za količinu korišćenog inokuluma kvasca u industriji etanola je 1×10^6 CFU/ml po procentu suve materije kukuruznog brašna. Pored navedene dve mogućnosti kontrole kontaminacije neophodno je stalno mikrobiološki kontrolisati proizvodnju etanola. Neophodna je kontrola kvasca, proizvodnog procesa, kontrola čišćenja uređaja, sudova, ventila i kontrola efikasnosti dejstva dezinfekcionih sredstava (Stojaković, 2001).

Mogućnost pojave inhibicije jedan je od značajnih faktora koji utiču na sam tok fermentacije. Jedan od inhibitora rasta kvasca i fermentacije je i sam etanol koji vrši nekompetitivnu inhibiciju. Fosfolipidi u citoplazmatičnoj membrani značajno utiču na tolerantnost kvasca na etanol (Ingram, 1984). Naime, etanol menja stepen polarnosti ćelijske membrane i citoplazme i na taj način negativno utiče na rast ćelije pri visokim koncentracijama etanola. Ovaj negativan uticaj se ogleda u povećanoj fluidnosti membrane. Na povećanje tolerantnosti na etanol utiču povećana koncentracija vitamina, proteina i nezasićenih masnih kiselina u membrani. Povećanju tolerantnosti na etanol mogu doprineti i drugi fiziološki faktori kao što su: sastav hranljive podloge, akumulacija etanola unutar ćelije, temperatura i osmotski pritisak (Banat i sar., 1998). Trehaloza predstavlja i stabilizator membrane i ima zaštitnu ulogu u kvašćevim ćelijama pri stanjima stresa tako da se smatra da njena koncentracija unutar ćelije ima važnu ulogu u sposobnosti kvasca da toleriše visoke koncentracije etanola.

Naime, toksičan uticaj etanola raste sa porastom temperature. Kvasac *S. uvarum* obično je manje tolerantan na etanol u odnosu na *S. cerevisiae*. Ispitivanja faktora koji utiču na toleranciju kvasca na etanol pokazala su da se mnogi problemi mogu prevazići primenom određenih azotnih jedinjenja, sterola i nezasićenih masnih kiselina. Smatra se da tolerancija na etanol nije svojstvena soju, već je određena uslovima fermentacije (Stojaković, 2001).

Tolerantnost na visoke temperature se takođe smatra značajnom karakteristikom komercijalnih sojeva kvasca. Visoke temperature uzrokuju povećanu fluidnost ćelijske membrane kvasca usled promene sastava masnih kiselina. Povećanje temperature uzrokuje i sintezu proteina koji imaju važnu ulogu kod tolerantnosti kvasca na etanol i temperaturu. Sinteza proteina se indukuje usled akumulacije delimično denaturisanih proteina. Akumulacija trehaloze je takođe povezana sa toplotnim stresom ćelije jer koncentracija trehaloze u ćeliji utiče na otpornost kvasca na toplotu.

4.3.2. Proizvodni mikroorganizmi

Alkoholnu fermentaciju mogu da izazovu predstavnici gljiva i bakterija. Od gljiva se posebno ističu kvasci. Oni produkuju brojne enzime koji imaju značajnu ulogu u alkoholnoj fermentaciji.

Mikroorganizmi se u procesu gajenja veoma brzo razmnožavaju jer imaju kratko generaciono vreme (Prescott i sar., 2002; Drapcho i sar., 2008). Tokom razmnožavanja se može meriti gustina populacije pri čemu se dobijaju vrednosti koje u zavisnosti od vremena formiraju karakterističnu krivu rasta populacije (slika 4.4). Prema brzini rasta i razmnožavanja mikroorganizama na krivoj se mogu razlikovati četiri osnovne faze: lag faza, logaritamska ili eksponencijalna faza, stacionarna faza i faza odmiranja mikroorganizama.

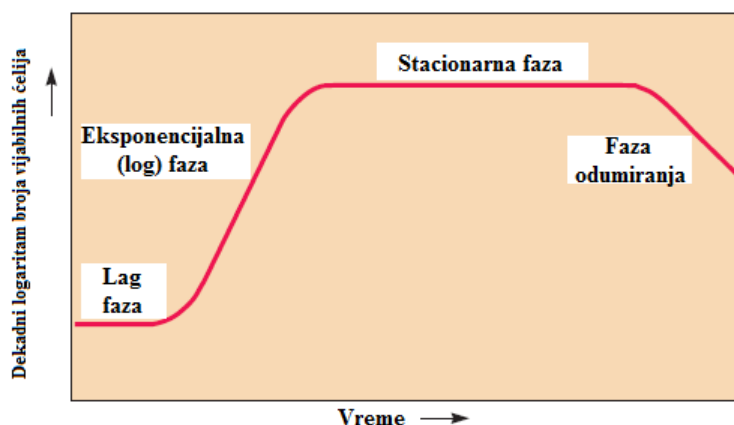
U **lag fazi** mikroorganizmi se ne razmnožavaju, to je faza mirovanja. U ovoj fazi se kvasac priprema za rast i udvostručavanje. Tokom ove faze odigravaju se velike promene u ćelijama kvasca. Sadržaj glikogena opada, a sadržaj masti raste. U lag fazi sadržaj glikogena je oko 27%, a masti 1-2%.

U **logaritamskoj**, odnosno **eksponencijalnoj fazi (faza ubrzanog rasta)**, kvasci se razmnožavaju geometrijskom progresijom. Generaciono vreme iznosi 3-4 sata. Tokom ove faze sadržaj masti u ćelijama dostiže 27%, a sadržaj glikogena se

smanjuje na 1-2%. Ova faza je od posebnog značaja za industrijsku proizvodnju, jer se u njoj stvara najveći broj proizvoda metabolizma. Ovde nastaje veći broj mikroorganizama nego što odumire. U ovoj fazi se mikroorganizmi najlakše mogu dezintegrisati delovanjem visokih temperatura ili hemijskih sredstava.

U **stacionarnoj fazi** isti broj mikroorganizama nastaje i odumire. Čelije i dalje proizvode etanol, ali rast (definisan kao udvostručavanje ćelija) prestaje. U ćelijama se sintetiše glikogen, a sadržaj masti opada. I u ovoj fazi dolazi do stvaranja vrlo značajnih proizvoda metabolizma određenih mikroorganizama kao što su vitamini.

Za prehrambenu industriju je lag faza posebno značajna. Teži se da se kod čuvanja namirnica stvore takvi uslovi kako bi ova faza što duže trajala da ne bi došlo do ubrzanog razmnožavanja mikroorganizama i kvarenja proizvoda.



Slika 4.4. Dijagram rasta mikroorganizma (Prescott i sar., 2002)

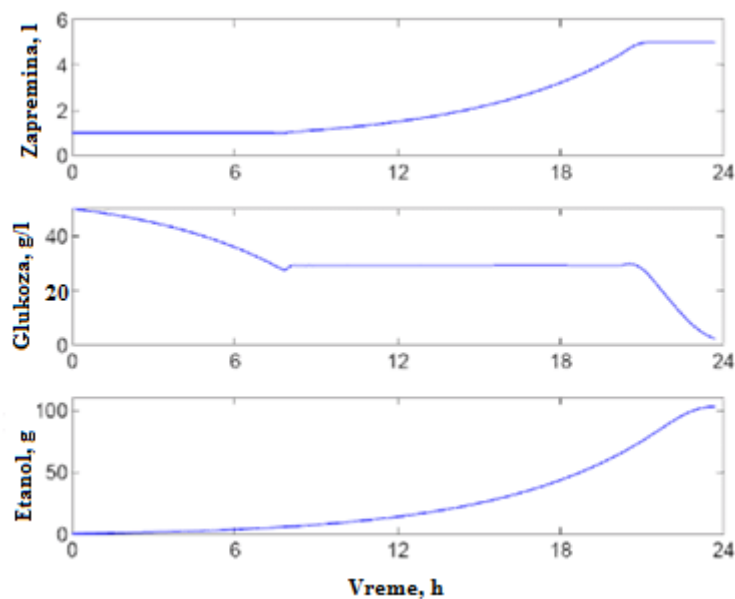
U industriji se danas primenjuju uglavnom dva sistema gajenja mikroorganizama:

- diskontinualni (statični, šaržni) i
- kontinualni (dinamički) sistem.

Kod diskontinualnih sistema se javljaju karakteristične faze u razmnožavanju mikroorganizama. Merenjem rasta populacije dobija se karakteristična kriva rasta, koja logaritamski-eksponencijano raste vrlo kratko, nezavisno od koncentracije supstrata i proizvoda metabolizma do određenih granica. Kada se iz podloge iscrpe nutrijenti i nakupe proizvodi metabolizma, proces se zaustavlja.

Kod kontinualnog tipa procesa se posle izvesnog vremena postižu stacionarni uslovi za gajenje u pogledu pojedinih jedinjenja, biomase i proizvoda metabolizma. Pri ovom sistemu gajenja mikroorganizam se može održavati u eksponencijalnoj fazi rasta pri konstantnim uslovima. Ovi uslovi u literaturi su poznati kao stacionarni (*steady state*, engl.).

Na slici 4.5. je prikazana dijagram zavisnosti optimalne zapremine supstrata potrebne za ćelijski ciklus u zavisnosti od koncentracije proizvedenog etanola.



Slika 4.5. Optimalna zapremina supstrata potrebna za ćelijski ciklus u zavisnosti od koncentracije proizvedenog etanola

4.3.2.1. Kvasci

Od mikroorganizama koji se najviše koriste u proizvodnji bioetanola najzastupljeniji su kvasci. Kvasci su heterotrofni eukariotski mikroorganizmi. To su većinom jednoćelijski mikroorganizmi koji su tokom evolucije izgubili sposobnost stvaranja micelija. Pripadaju gljivama različitih sistematskih grupa. Fiziološki se razlikuju u odnosu na bakterije zbog toga što prilikom razmnožavanja dolazi do spajanja kompletnog genetskog materijala između dve jedinke, posle čega nastupa redukciona deoba. Seksualni način razmnožavanja je kod kvasaca češći nego kod bakterija, iako kod nekih sojeva kvasaca još uvek nije otkriven.

Kvasci prema načinu ishrane spadaju u hemoorganotrofne organizme zato što koriste organska jedinjenja kao izvor energije i ne zahtevaju sunčevu svetlost za rast.

Glavni izvori ugljenika za kvasce su heksoze, odnosno monosaharidi glukoza i fruktoza, ili disaharidi kao što su saharoza i maltoza. Neke vrste mogu da metabolišu i pentoze kao što je riboza, alkohole i organske kiseline.

Kvasci su prema potrebama za kiseonikom fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Prema temperaturama koje zahtevaju za rast i razvoj pripadaju grupi mezofilnih mikroorganizama, čija je optimalna temperatura 25-45°C. Određeni sojevi su prilagođeni da rastu na nižim temperaturama („hladni kvasci“). Većina kvasaca je osetljiva na dejstvo dezinfekcionih sredstava (npr. SO₂). Pojedini sojevi kao što je, na primer „sulfitni“, mogu da podnesu veće koncentracije sumpornih jedinjenja. U tome se posebno ističu sojevi iz roda *Saccharomyces* koji podnose koncentracije sumpornih jedinjenja pri kojima drugi mikroorganizmi ne mogu da opstanu.

Većina kvasaca može da fermentiše podloge koje sadrže 4-16% šećera. Osmofilni kvasci se razvijaju u koncentrovanijim podlogama kao što su marmelada, džem i slatko. To su predstavnici iz roda *Saccharomyces* koji je ranije označavan kao *Zygosaccharomyces*.

Kvasci se obično razvijaju u sredinama koje sadrže do 10% alkohola. Metabolizmom mogu da produkuju 16-17 vol. % alkohola. Posebni sojevi mogu da proizvedu i oko 20% etanola. Za industrijsku proizvodnju su najznačajniji predstavnici iz roda *Saccharomyces*. To su pravi kvasci koji se razmnožavaju pupljenjem. Sojevi pivskog kvasca *Sacc. cerevisiae* se primenjuju u raznim fermentacionim postupcima i mogu se podeliti na kvasce „gornjeg vrenja“ (stvaraju penu na površini fermentacione smeše, optimalna temperatura pri kojoj su metabolički aktivni je najčešće između 15 i 20°C) i kvasce „donjeg vrenja“ (ne stvaraju penu, optimalna temperatura na kojoj su metabolički aktivni je oko 10°C). Od pivskih kvasaca „donjeg vrenja“ najznačajniji je *Sacc. carlsbergensis (uvarum)*. Od vinskih kvasaca poznata je vrsta *Sacc. cerevisiae* var. *elipsoideus* ovalnog oblika. Štetne vrste koje mute pivo su *Sacc. turbidans* i *Sacc. pastorianus*, koji izaziva gorčinu piva. U prirodi je veoma rasprostranjena vrsta kruškastog odnosno limunastog oblika *Kloeckera apiculata*, koja može da produkuje 4 – 6% alkohola. U toplijim krajevima od većeg značaja su vrste iz roda *Schizosaccharomyces* koje previru sok šećerne trske. Tako je npr. *Sch. pombe* izdvojen iz afričkog piva našao primenu u dobijanju alkohola na višim temperaturama (32-42°C) u Meksiku i Argentini. Takođe se može koristiti u našim krajevima za dobijanje žestokih pića (jabukovača).

U pekarstvu se koriste odgovarajući sojevi kao pekarski kvasci. Predstavnici iz roda *Saccharomyces* (*S. ludwigi*) otporni su na više koncentracije SO₂. Osmofilni kvasci se mogu razvijati pri višim koncentracijama suve materije. Poznati su još i kao osmotolerantni.

Neki sojevi kvasaca zahtevaju prisustvo kiseonika za aerobno ćelijsko disanje (obligatni aerobi), neki su anaerobni ali mogu i aerobno da proizvode energiju (fakultativni anaerobi). Za razliku od bakterija, nisu poznati sojevi kvasca koji su obligatni anaerobi. Kvasci se najbolje razvijaju u neutralnim ili blago kiselim uslovima pH. Rastu u rasponu temperature 10°C do 37°C, pri čemu je optimalna temperatura između 30°C i 37°C, u zavisnosti od vrste (za *S. cerevisiae* optimalna temperatura je 30°C). Preko 37°C ćelije kvasca su pod stresom i više se ne dele istom brzinom. Većina ćelija kvasca odumire na temperaturama iznad 50°C. Ako podloga dosegne 105°C kvasac će se dezintegrirati. U rasponu temperature od 0-10°C fiziološka aktivnost je zanemarljiva. Pod određenim uslovima ćelije mogu da prežive zamrzavanje, pri čemu vijabilnost opada tokom vremena.

Fermentativni kvasci vrše anaerobnu disimilaciju, energično fermentišu šećere, pri čemu nastaju CO₂ i etanol. U tečnim podlogama ne stvaraju površinsku skramu ali zamućuju podlogu i stvaraju talog. Najznačajniji predstavnici su:

Saccharomyces cerevisiae – ćelije su okrugle ili ovalne, pojedinačne i u parovima. Ne stvara navlaku ali ponekad stvara tanak, nekompletan prsten i talog. Obično ne formira lažne micelije. Vegetativno se razmnožava multipolarnim pupljenjem a polno stvaranjem askospora. Askusi sadrže 1 - 4 ovalne askospore.

Saccharomyces cerevisiae var. *elipsoideus* je najviše zastupljena vrsta u alkoholnoj fermentaciji vina. Posle završene fermentacije retko zaostaju u vinu jer brzo izumiru pa ne predstavljaju opasnost za narednu fermentaciju.

Saccharomyces carlsbergensis (*uvarum*) je tipičan kvasac donjeg vrenja pивske industrije. Fermentiše galaktozu, glukozu, maltozu, melobiozu, rafinozu i saharozu. Laktozu ne fermentiše.

Schizosaccharomyces pombe - stvara sferoidne i pravougaone ćelije. Aseksualno se razmnožava deljenjem (stvaranjem pregrada tj. pravog micelijuma koji se cepa na artrospore), a seksualno - stvaranjem askusa sa 4-8 askospora. Fermentiše glukozu i saharozu a ne fermentiše galaktozu i laktozu. Koristi se za fermentaciju u toplijim krajevima (Afrika) jer podnosi visoke temperature (afričko pivo).

Kloeckera apiculata – ćelije su u obliku limuna, ovalne ili izdužene. To je divlji kvasac i najčešće je začetnik divljeg vrenja. Razmnožava se bipolarnim pupljenjem i obično ne stvara, osim u pojedinim slučajevima, lažnu miceliju. Sve vrste fermentišu glukozu, a neke i saharozu. Brzo se razmnožava na čvrstim podlogama, plod je krem do žute boje, a u sladnom bujonu stvara talog i obično nepotpun prsten.

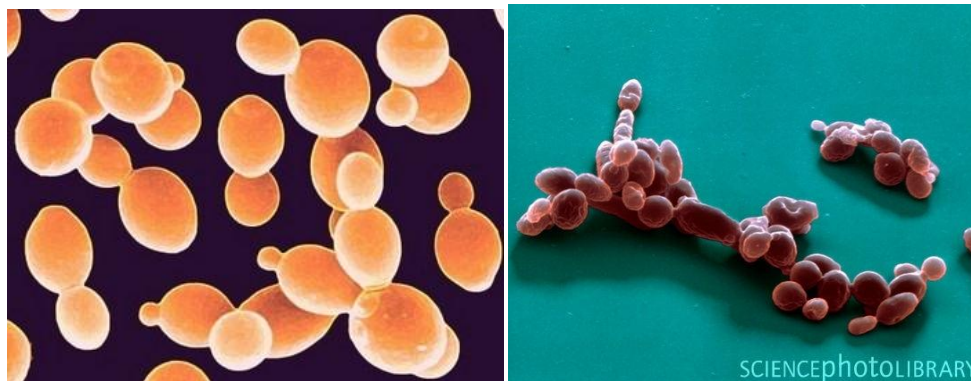
Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je mikroorganizam koji se najčešće koristi za proizvodnju bioetanola iz skrobnih i šećernih sirovina (slika 4.6). Ovaj kvasac je najviše eksploatisani mikroorganizam u industriji i još uvek je primaran za proizvodnju etanola i alkoholnih pića (pivski kvasac "gornjeg vrenja").

Glavni metabolički put kod alkoholne fermentacije je glikoliza (Embden-Meyerhof-Parnas ili EMP put), kojim se metaboliše jedan molekul glukoze, i dobijaju se dva molekula piruvata (Madigan i saradnici, 2000), kao što je ilustrovano na slici 4.7. Pod anaerobnim uslovima, piruvat se dalje redukuje do etanola uz oslobađanje CO₂.

Teorijski prinos iznosi 0,51 kg etanola i 0,49 kg CO₂ po masi metabolisane glukoze. Dva molekula ATP-a nastala glikolizom koriste se za iniciranje biosinteze ćelija kvasca koja se sastoji od više bioreakcija koje iziskuju energiju. Iz tog razloga je proizvodnja etanola povezana sa rastom ćelija kvasca, što znači da kvasac mora biti sporedni proizvod. Bez kontinualne potrošnje ATP-a za rast ćelija kvasca, glikolitički metabolizam glukoze se narušava zbog akumuliranja ATP-a unutar ćelije, koji inhibira fosfofruktokinazu (PFK), jedan od najvažnijih enzima za odvijanje glikolize.

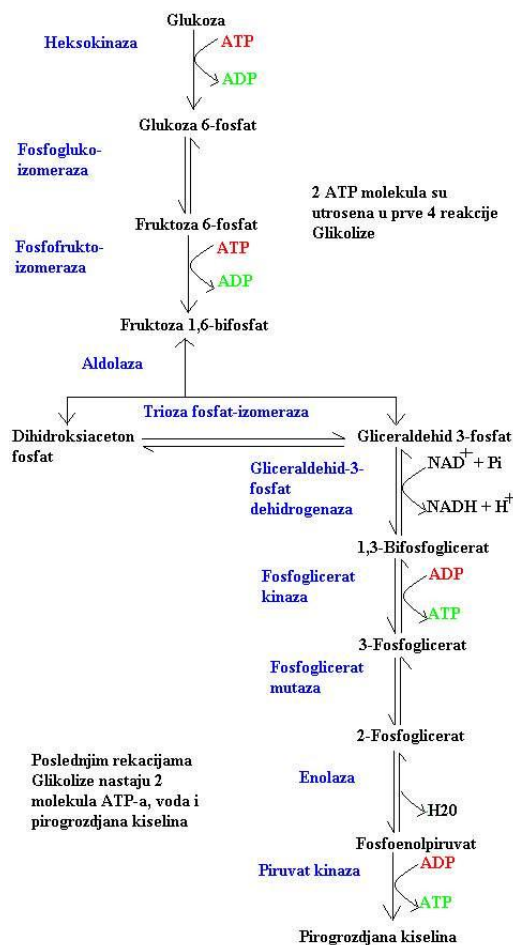
Osim etanola i ugljen-dioksida tokom procesa fermentacije nastaju i drugi sporedni proizvodi. Glicerol je najvažniji od njih (1% zapreminske mase). Viši pH smeše, povišeni osmotski pritisak i drugi faktori mogu stimulisati konverziju dihidroksiaceton fosfata do glicerola (Ingldeew, 1999). Drugi nusprodukti kao što su organske kiseline i viši alkoholi nastaju u znatno manjoj količini. Sinteza ovih nusproizvoda, kao i rast ćelija kvasca, usmeravaju neke međuproizvode glikolize ka odgovarajućim metaboličkim putevima, smanjujući tako prinos etanola. U industriji se prinos etanola računa na osnovu ukupnog šećera unetog u fermentor bez odbijanja rezidualnog šećera i može iznositi oko 90-93% od teorijske vrednosti prinosa etanola (Ingldeew, 1999). Zbog toga se koncentracija rezidualnog šećera mora održavati na niskom nivou. Na primer, u proizvodnji etanola iz skrobnih sirovina koncentracije rezidualnih redukujućih šećera i ukupnih šećera ne bi trebalo da budu veće od 2 g l⁻¹ i 5 g l⁻¹.

Do sada je poznato da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može da proizvodi 10-12% etanola (Mojović i sar., 2007). Međutim, postoje tvrdnje i indicije da ćelije kvasca mogu proizvesti i do 23% etanola (Pejin i sar., 2000). Postavlja se pitanje da li je u proizvodnim uslovima moguće ostvariti ovako visoke koncentracije etanola u fermentacionoj podlozi, kao i koji su preduslovi potrebni za postizanje maksimalne koncentracije etanola prilikom fermentacije kvascima.



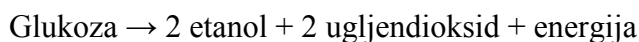
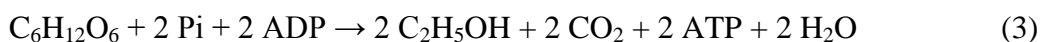
Slika 4.6. Ćelije kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* (levo) i *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (desno)

Šećeri koje ovaj mikroorganizam može da metaboliše jesu: glukoza, fruktoza, manoza, galaktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza. *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi etanol putem glikolize (Embden- Meyerhof- Parnas ili EMP put) (slika 4.7).

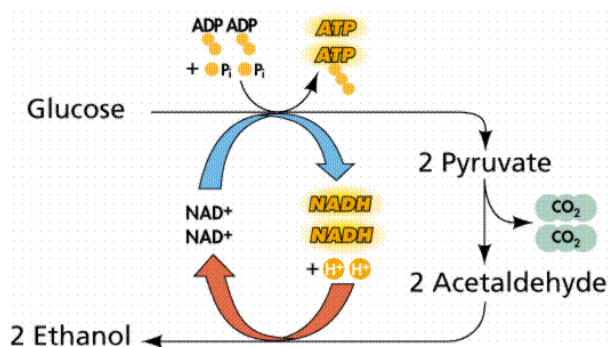


Slika 4.7. Glikolitički (EMP) put za dobijanje etanola kod kvsca *S. cerevisiae*

U najprostijem obliku, dobijanje etanola iz glukoze se može prikazati jednačinom:



Na slici 4.8. šematski je prikazana reakcija (3) razgradnje glukoze.



Slika 4.8. Šematski prikaz razgradnje glukoze do etanola

Iz ove jednačine se može izračunati da je teorijski prinos 0,51 g etanola po gramu glukoze.

Ovaj prinos se u praksi nikada ne ostvaruje, jer se ne prevodi sva uneta glukoza u etanol, već se jedan deo koristi za sintezu ćelijske mase, održavanje ćelijskih funkcija i stvaranje sporednih proizvoda kao što su glicerol, sirćetna kiselina, mlečna i ćilibarna kiselina. Međutim, pod odgovarajućim uslovima se može postići 90 do 95% od teorijskog prinosa. Određivanjem ukupnog prinosa etanola indirektnom laboratorijskom metodom merenja prinosa ugljen-dioksida i proračuna odgovarajućeg prinosa etanola na osnovu stehiometrijske jednačine (2) može se utvrditi da pored etanola kvasac *S. cerevisiae* proizvodi sporedne proizvode u čijoj sintezi učestvuje ugljen-dioksid. Međutim, ovi sporedni proizvodi se obično proizvode u veoma niskim koncentracijama ($<1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), i greška do koje dovode u kalkulaciji totalnog prinosa etanola zasnovanoj na prinosu ukupnog ugljen-dioksida je mala ($< 2\%$). Najznačajniji sporedni proizvod procesa fermentacije je glicerol koji čini 1% zapreminskog udela. Sinteza glicerola ne uključuje ugljen-dioksid (Drapcho i sar., 2008). Drugi nusprodukti kao što su organske kiseline i viši alkoholi nastaju u znatno manjoj količini.

Transport šećera je prvi i najznačajniji korak u proizvodnji etanola. Smatra se da je to korak koji određuje brzinu u procesu glikolize kod kvasca. *Saccharomyces cerevisiae* ima kompleksan i veoma efikasan sistem za transport šećera. Postoji 20 gena koji kontrolišu transport heksoza u genomu. Brzina transporta može premašiti 10^7 molekula glukoze po ćeliji u sekundi u brzo fermentišućim ćelijama. Transporteri heksoza kod *Saccharomyces cerevisiae* se mogu podeliti u 3 grupe: transporteri niskog afiniteta ($K_{m(\text{glukoza})} = 50\text{--}100 \text{ mM}$), transporteri umerenog afiniteta ($K_{m(\text{glukoza})}$ oko 10 mM), i transporteri visokog afiniteta ($K_{m(\text{glukoza})} = 1\text{--}2 \text{ mM}$). I pored velike složenosti sistema, svi transporteri heksoza u *Saccharomyces cerevisiae* koriste olakšanu difuziju za transport glukoze. Ovaj način transporta zahteva samo gradijent koncentracije kroz plazma membranu. Saharoza, najzastupljeniji šećer u šećernoj trski i šećernoj repi, hidrolizuje se do glukoze i fruktoze pomoću enzima invertaze, koja se nalazi između ćelijske membrane i ćelijskog zida. Zatim se ova dva monosaharida resorbuju u ćeliji kvasca. Fruktoza ulazi u put glikolize prevodeći se u fruktoza-6-fosfat pomoću heksokinaze.

Dva šećera dobijena u hidrolizi skroba, maltoza i maltotrioza, prolaze neizmenjeni kroz ćelijsku membranu, a zatim se unutar ćelije hidrolizuju do glukoze pomoću enzima α -glukozidaze. *S. cerevisiae* ne može da metaboliše maltotetriozu i više polisaharide (dekstrine).

Glukoza i saharoza su dva najčešće korišćena supstrata koje metaboliše *S. cerevisiae*. Kada je u nekom industrijskom procesu prisutno više vrsta šećera, glukoza i saharoza se uvek prve troše. Naime, prisustvo ova dva šećera suzbija iskorišćenje i metabolisanje drugih šećera. Ova katabolička represija je posledica kompeticije za transportere šećera i regulacionih gena koji su zaduženi za resorpciju i metabolizam drugih šećera. Na primer, resorpciju fruktoze usporava glukoza jer oba šećera u ćeliju transportuju isti prenosioči, koji imaju veći afinitet prema glukozi. Takođe, glukoza može da umanja ekspresiju specifičnih transportera fruktoze. Glukoza ometa ekspresiju gena za resorpciju maltoze, čak i kada je maltoza prisutna. Glukoza takođe izaziva represiju gena za iskorišćenje galaktoze čak i u prisustvu šećera. Katabolička represija ne prestaje pošto se glukoza i saharoza potroše. U stvari, ovaj efekat može trajati još nekoliko sati. Represija iskorišćenja šećera posredstvom glukoze i/ili saharoze može imati negativan uticaj na brzinu fermentacije u industrijskoj proizvodnji etanola.

Saccharomyces cerevisiae za rast i alkoholnu fermentaciju zahteva minerale: Ca, Mg, Mn, Co, Fe, Cu, K, Na, Zn. Pokazalo se da određena organska jedinjenja takođe pospešuju proizvodnju etanola. Većina neophodnih nutrijenata je obično već prisutna u industrijskim sirovinama (hranljivim podlogama) za proizvodnju etanola. Rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* inhibira i sam etanol. Etanol povećava propustljivost ćelijske membrane i izaziva propuštanje jona i proizvoda metabolizma male molekulske mase. Kinetika rasta i inhibicije alkoholne fermentacije, može se prikazati sledećim jednačinama (Drapcho i sar., 2008):

$$\mu_{Sg} = \mu_{Sog} [1 - (S/S_{max})]^n \quad (4)$$

$$f_{Sf} = f_{Sof} [1 - (S/S_{max}^*)]^{n^*} \quad (5)$$

gde su μ_{Sog} i μ_{Sg} specifične brzine rasta u odsustvu ili prisustvu koncentracije S etanola, respektivno, f_{Sof} i f_{Sf} su specifična brzina fermentacije u odsustvu i prisustvu koncentracije etanola S , respektivno, S_{max} i S_{max}^* su maksimalne koncentracije etanola koje dozvoljavaju rast i fermentaciju, respektivno, n i n^* su toksična moć etanola računati za rast i fermentaciju. Vrednosti za n i n^* mogu se odrediti iz eksperimentalnih

podataka. U praksi, vrednosti za S_{max} i S^*_{max} su između 10% (v/v) i 15% (v/v). Ako su koncentracije glukoze u podlozi visoke, inhibira se metabolizam kvasca i nema nastajanja etanola, zbog čega se preporučuje postepeno dodavanje glukoze. Čelije kvasca mogu da opstanu i prežive u podlozi koja sadrži i do 30% etanola. Inhibicija etanolom za *S. cerevisiae* može se ukloniti dodavanjem kalcijuma. Međutim, dodavanje kalcijuma u fermentor mora se dobro kontrolisati jer visoki količnik Ca:Mg može izazvati antagonizam osnovnih biohemijskih funkcija magnezijuma i negativno uticati na rast i produkciju etanola. Sirćetna i mlečna kiselina takođe mogu inhibirati *S. cerevisiae*. U alkoholnoj fermentaciji ove kiseline su sporedni proizvodi koji se nagomilavaju u relativno malim koncentracijama, koje su znatno ispod praga inhibicije. Međutim, u industrijskoj proizvodnji etanola, nikada se ne postižu potpuno sterilni uslovi i kontaminacija bakterijama mlečnokiselinskog i sirćetnog vrenja može povećati koncentraciju ovih kiselina do štetnih razmera. Inhibitorni uticaji mlečne i sirćetne kiseline na rast i proizvodnju etanola imaju sinergistički efekat i zavise od pH.

Da bi se eliminisala mlečna kiselina, potrebno je u podlogu dodavati „Lactoside“- antimikrobno sredstvo efikasno u širokom intervalu temperature i pH koje deluje efikasno protiv mikroorganizama iz rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Tokom fermentacije potrebno je održavati temperaturu što nižom. Povišenje temperature za svakih 10 stepeni povećava smrtnost ćelija kvasca od mlečne kiseline i etanola i do 10 puta.

Kiseonik igra značajnu ulogu u metabolizmu *S. cerevisiae*. Rast je manje inhibiran etanolom u mikroaerobnim uslovima u odnosu na anaerobne uslove. Uslovi aeracije takođe utiču na sintezu sporednih proizvoda. Kada se respiratorni kvocijent (*respiratory quotient*) (RQ) održava na vrednostima 17 ili niže, sinteza glicerola se skoro eliminiše. Međutim, višak kiseonika dovodi do značajno više produkcije ćelijske mase i nižeg prinosa etanola. Zbog toga se u praksi moraju pažljivo odrediti optimalni uslovi aeracije kako bi se postigla optimalna produkcija etanola.

Tokom fermentacije, ćelije kvasca trpe više tipova stresa. Neki su uslovljeni okruženjem ili podlogom za rast, kao što je nedostatak nutrijenata, visoke temperature i kontaminacija, dok su drugi posledica metabolizma ćelije kvasca kao što je akumuliranje etanola i odgovarajuća inhibicija ćelijskog rasta kvasca i produkcije etanola, posebno u uslovima jake gravitacije.

Mnogi od ovih stresova su sinergistički, i utiču na ćelije kvasca mnogo izraženije nego pojedinačni stresovi, što dovodi do smanjenja vijabilnosti i smanjenog prinosa etanola. Istraživanja su pokazala da ćelije u fazi pupljenja imaju sposobnost da proizvode etanol više od 30 puta brže nego ćelije koje su u fazi mirovanja.

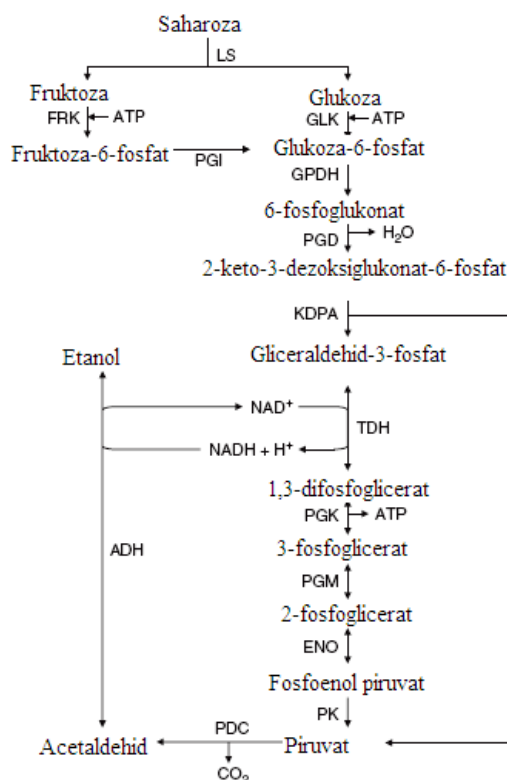
U tehnologiji proizvodnje etanola, fermentacija se vodi tako da ćelije kvasca započnu fermentaciju brzo. Istovremeno, kada sadržaj etanola dostigne 11-12%, smanjuje se broj ćelija koje pupe i stres na ćelije se povećava.

Nivo trehaloze u membranama igra glavnu ulogu u toleranciji na etanol. Kompanija Alltech pronašla je da kad je koncentracija trehaloze visoka u kvascu se istovremeno mogu postići dva cilja: brz početak i brz kraj. Ova kompanija je patentirala Super TwinTM soj pomoću dva soja kvasca - 1230 suvog kvasca koji prvi počinje pupljenje i soja 1226 suvog kvasca koji započinje proizvodnju etanola brže u fermentaciji. Soj 1226 sa faktorom trehaloze podstiče aktivnost pupljenja pri kraju fermentacije. Super TwinTM sadrži povoljan odnos glikogena i trehaloze koji je potreban da pomogne kvascu da prevaziđe neminovni stres alkoholne fermentacije. Pupljenje kvasca započinje ranije i nastavlja se duže i tako daje veće mogućnosti za alkoholnu fermentaciju. U literaturi su izneti podaci da je izolovan termostabilan soj kvasca Termo-SaccTM. Ovaj kvasac može da podnosi visoke koncentracije etanola i visoke temperature. U ćelijama ovog kvasca nalazi se visok sadržaj trehaloze. On na temperaturi od 38°C može da proizvede oko 18% etanola. Pored toga može da toleriše i do 20% etanola u podlogama. Ćelije ovog kvasca su prečnika 5µm, odnosno mnogo su manje od ćelija kvasca koje se uobičajeno koriste u tehnologiji proizvodnje etanola (8-10 µm). Broj ćelija ovog kvasca tokom fermentacije na 38°C, pri koncentraciji etanola od 18% je 195×10^6 po ml. Pod ovim uslovima vijabilnost ćelija je bila 85%, dok je vijabilnost kontrolnog kvasca na 38°C, pri koncentraciji etanola od 16% bila samo 35%. Ispitivanja su pokazala da se proteini termostabilnih mikroorganizama i enzima malo razlikuju po sekvencama aminokiselina. Ovo omogućava proteinima da se savijaju na različitim mestima i zbog toga ih nije lako denaturisati. Veruje se da proteini sadrže više ugrađenih mostova sa solima, tako da to čini proteine kompaktnijim (sa većom gustinom). Njihove membrane su bogatije zasićenim masnim kiselinama. Termo-SaccTM sadrži više trehaloze nego kvasci koji se obično koriste za fermentaciju etanola (Mojović i sar., 2007).

4.3.2.2. Bakterije

Osim kvasaca, kao proizvodni mikroorganizam za dobijanje etanola mogu se koristiti i neke bakterije. Među bakterijama su najznačajnije *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* i *Thermoanaerobacter ethanolicus*.

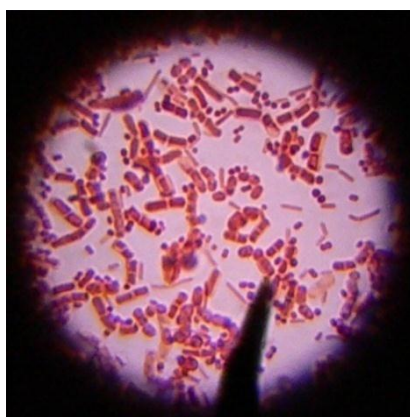
Zymomonas mobilis je anaerobna, gram-negativna bakterija koja proizvodi etanol iz glukoze Entner-Doudoroff (ED) pomoću enzima piruvat dekarboksilaze (PDC) i alkohol dehidrogenaze (ADH) (Conway, 1992), kao što je ilustrovano na slici 4.9. (Drapcho i sar., 2008).



Slika 4.9. Put biosinteze etanola u *Z. mobilis*. (LS: levansaharaza;GLK: glukokinaza; FRK: fruktokinaza; PGI: fosfoglucoza izomeraza; GPDH:glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; PGD: 6-fosfoglukonatdehidrataza; KDPa: 2-keto-3-dezoksi-6-fosfoglukonat aldolaza; TDI: trioza fosfatizomeraza; TDH: trioza fosfat dehidrogenaza;PGK: 3-fosfogliceratkinaza; PGM: fosfoglicerat mutaza; ENO: enolaza; PK: piruvat kinaza; PDC: piruvat dekarboksilaza; ADH: alkohol dehidrogenaza)

Iako još uvek nije u komercijalnoj upotrebi, *Zymomonas mobilis* se smatra najefikasnijim mikroorganizmom za proizvodnju bioetanola. Može da proizvodi etanol mnogo brže nego *S. cerevisiae*. U poređenju sa EMP putem koji koristi *S. cerevisiae*, koji uključuje razgradnju fruktoza-1,6-difosfata fruktozadifosfat -aldolazom da bi se dobio po jedan molekul gliceralehid-3-fosfata i dihidroksiaceton fosfata, ED putem

nastaje gliceraldehid-3-fosfat i piruvat, razgradnjom molekula 2-keto-3-deoksi-glukonat aldolaze, čime se dobija samo jedan molekul ATP-a po molekulu glukoze. Primenom *Zymomonas mobilis* dobija se manje biomase nego primenom *Saccharomyces cerevisiae*, a troši se i više ugljenika za alkoholnu fermentaciju. Na slici 4.10. prikazane su ćelije bakterija *Zymomonas mobilis* uveličane mikroskopom.



Slika 4.10. Ćelije bakterija *Zymomonas mobilis*

I pored toga, *Z. mobilis* nije pogodan za industrijsku proizvodnju etanola. Glavni razlog je to što ovaj soj metaboliše veoma specifičan spektar supstrata koji obuhvata samo tri vrste šećera: D-glukozu, D-fruktozu i saharozu. Rast na saharozi je praćen nastankom fruktoznih oligomera – levana i sorbitola što znatno umanjuje prinos etanola (Sprenger, 1996), zbog čega nije pogodan za proizvodnju etanola iz melase. Građenje ova dva sporedna proizvoda dovodi do smanjenja prinosa etanola iz saharoze. Prisustvo levana i drugih polimera fruktoze, takođe može izazvati probleme u toku procesa proizvodnje kao što je kvarenje destilacionih kolona i druge opreme. Potrebno je saharozu prevesti u glukozu i fruktozu pomoću enzima levansaharaze pre nego što se ova dva monomerna šećera mogu iskoristiti u proizvodnji etanola. S obzirom da može efikasno da fermentiše samo glukozu u hidrolizatima skrobnih sirovina, a ne i ostale proste šećere koji nastaju tokom hidrolize (saharozu, fruktozu i maltozu), nije pogodan ni za proizvodnju etanola iz skrobnih sirovina. U industriji se ne može koristiti čista glukoza kao sirovina, za razliku od laboratorijskih istraživanja. Drugi značajan razlog za ograničenu primenu *Zymomonas mobilis* je taj što, iako je u načelu označen kao bezbedan (GRAS - *generally regarded as safe*, engl), njegova biomasa obično nije prihvatljiva za primenu u hrani za životinje, čime nastaje problem odlaganja nastale biomase (Lin i Tanaka, 2006). Istraživanja su takođe pokazala da je kontinualni

postupak fermentacije pomoću *Zymomonas mobilis* oscilatoran odnosno neujednačen (Daugalis i sar., 1997; McLellan i sar., 1999). Ove oscilacije kontinualnog postupka fermentacije mogu ublažiti posledice stresa na mikroorganizam kao što su inhibicija etanolom i šećerom, i povećati proizvodnju etanola u postrojenju za fermentaciju. Oscilacije takođe mogu dovesti do povećanja koncentracije rezidualnih šećera i shodno tome smanjiti prinos etanola. Ako se uzmu u obzir ovi nedostaci, dolazi se do zaključka da su neka istraživanja mogućnosti proizvodnje etanola iz *Zymomonas mobilis* pogrešno usmerena, iako imaju određenu naučnu vrednost.

Najznačajnija razlika između biohemijskih puteva *Z. mobilis* i *S. cerevisiae* sastoji se u odsustvu koraka koji katalizuje enzim PFK (fosfofruktokinaza) u ED putu. PFK je ključni enzim u procesu glikolize. Ovaj enzim je zastupljen kod kvasaca. Zbog odsustva PFK enzima kod *Z. mobilis*, dobijanje etanola nije povezano sa stvaranjem energije. Drugim rečima, da bi se proizveo etanol, nije neophodno da se ćelije razmnožavaju i nije potrebna velika koncentracija ćelija da bi se postigao veliki prinos etanola. To znači da je prinos etanola još bliži teorijskoj vrednosti. Pokazalo se da se prinos etanola nezavisno od ćelijskog rasta i efikasnosti konverzije približava 97% od teorijskog prinosa (Sprenger, 1996). Ostale prednosti *Z. mobilis* jesu veliko iskorišćenje šećera, velike brzine stvaranja etanola, i to što za optimalnu alkoholnu fermentaciju nije neophodna aeracija. I *S. cerevisiae* i *Z. mobilis* produkuju organske kiseline kao sporedne proizvode, ali u različitim odnosima. Odnos sirćetne i mlečne kiseline je obično 16:1 za *Z. mobilis* i 8:1 za *S. cerevisiae*. Zbog toga pH fermentacionog medijuma koji se koristi za *S. cerevisiae* može opasti do 3, dok u slučaju *Z. mobilis* teži da se stabilizuje na 4,5. Pošto je rast većine bakterija koje bi mogle da kontaminiraju podlogu skoro potpuno inhibiran na pH 3, ali ne u tolikoj meri na pH 4,5, fermentacioni medijum za *Z. mobilis* mora da se sterilise kako bi se postigao adekvatan prinos etanola. To je nepoželjno na industrijskom nivou jer sterilizacija velikih zapremina medijuma iziskuje velike troškove proizvodnje. Još jedna prednost kvasca *S. cerevisiae* je jednostavnost rukovanja ovim organizmom. Starter kulture kvasca se mogu kupiti u različitim oblicima, a njihova propagacija u većini slučajeva zahteva samo posude sa mešanjem uz minimalnu kontrolu.

S druge strane, da bi se *Z. mobilis* koristio u komercijalnoj proizvodnji etanola, mora se održavati stok kultura željenih osobina u postrojenju, potrebno je nekoliko fermentora za umnožavanje sa strogom regulacijom za umnožavanje inokuluma do odgovarajućeg nivoa za upotrebu u proizvodnim fermentorima.

Iako se *Z. mobilis* trenutno ne koristi u komercijalnoj proizvodnji etanola, interesovanje za ovaj mikroorganizam je i dalje veliko. Istraživači su uložili veliki napor u cilju unapređenja procesa proizvodnje etanola korišćenjem ovog mikroorganizma. Na primer, napravljeni su posebni sistemi bioreaktora koji koriste imobilisane ćelije kako bi se ispunio zahtev za malim priraštajem ćelijske mase.

Kreirani su genetički modifikovani mikroorganizmi koji poseduju veću toleranciju na etanol kao i sposobnost da metabolišu različite supstrate do etanola. Tako, na primer, prirodni oblik *Zymomonas mobilis* metaboliše šećere sa šest ugljenikovih atoma (heksoze glukoze, fruktoze, saharoze) u etanol, dok genetički modifikovan *Zymomonas mobilis* može da metaboliše i šećere sa pet C atoma (pentoze) do etanola. Ovako modifikovan proizvodni mikroorganizam ima sposobnost da fermentiše glukoze i ksiloze do etanola, što je veoma značajno za fermentaciju lignoceluloznih supstrata. Nedavno je konzorcijum akademskih i industrijskih istraživača iz Koreje objavio čitavu sekvencu gena 2.06 Mb *Z. mobilis*-a ZM4 (Drapcho i sar., 2008). Ova informacija će omogućiti poboljšanja u proizvodnji etanola kao i eksploataciji ovog mikroorganizma u razvoju drugih industrijski važnih proizvoda.

Jedan od osnovnih nedostataka procesa sa korišćenjem genetički modifikovanih mikroorganizama je nedovoljna stabilnost mikroorganizama jer tokom vremena može doći do reverzije (gubitka ubačenih gena) i samim tim gubitka poželjnih osobina. Pored toga, genetički modifikovani mikroorganizmi sporije rastu, a sam proces zahteva veće mere bezbednosti da ne bi došlo do oslobađanja genetički izmenjenih mikroorganizama.

4.3.3. Tipovi proizvodnih postupaka fermentacije za sintezu bioetanola

Postupak alkoholne fermentacije se u proizvodnji etanola može izvoditi na četiri načina: diskontinualno, kontinualno, dolivno i semikontinualno. Najčešće se primenjuju diskontinualne i kontinualne metode fermentacije. Prilikom razmatranja primene određenog sistema uzimaju se u obzir osobine sirovine koja će se koristiti, troškovi ulaganja, kao i cene opreme i sirovina. Proces koji će se primenjivati u industriji je onaj koji zahteva minimum ulaganja za opremu uz maksimalne količine proizvoda (Mojović i sar., 2007)

Diskontinualni postupak predstavlja šaržnu fermentaciju ugljenohidratnih komponenata podloge koja se odvija u trajanju od 36-48 h, sa prinosom od 90-95% od teorijskog prinosa i finalnom koncentracijom etanola od 10-16% (vol). Fermentisana podloga se nakon fermentacije pumpom prebacuje u prihvatni sud iz koga se napajaju destilacione kolone. Fermentor se nakon pražnjenja pere, sterilise i započinje se sa novom fermentacijom. Vreme koje se izgubi pražnjenjem, pranjem i punjenjem smanjuje korisnu zapreminu fermentora za oko 20%. Ovaj proces ima više prednosti: niske investicije; ne zahteva mnogo kontrole; jednostavna sterilizacija; ne zahteva naporan rad; mali rizik od finansijskih gubitaka; lako vođenje procesa; velika fleksibilnost se postiže upotrebom fermentora za razne specifičnosti produkata; dobro definisanje trajanja fermentacije tako da se mogu ostvariti visoki nivoi konverzije; nizak rizik od infekcije i mutacije ćelija ako se koristi relativno kratko vreme fermentacije. Nedostaci ovih sistema su: neproaktivno vreme za pražnjenje, pranje, sterilizaciju, hlađenje, zagrevanje i ponovno postavljanje fermentora (fermentor je iskorišćen samo 80%); česte sterilizacije mogu dovesti do oscilovanja u mernim instrumentima; češće pripremanje inokuluma i kontrola ovog nestacionarnog procesa zahteva više tokova; veći rizik za osoblje od mogućeg kontakta sa patogenim mikroorganizmima i toksičnim produktima; inicijalna lag faza smanjuje produktivnost fermentora. Pored ovih nedostataka, diskontinualni način vođenja fermentacije preporučuje se u fabrikama malog kapaciteta, jedan fermentor je dovoljan da se proizvede veći broj produkata. Efikasnost diskontinualne fermentacije može se povećati uvođenjem recirkulacije kvasca ("Melle Boinot postupak").

Dolivni postupak (feed batch) predstavlja kombinaciju diskontinualnog i kontinualnog. Hranljiva podloga se dozira tako da se koncentracija izvora ugljenika održava konstantnom. Na ovaj način se inhibicija supstratom održava na minimumu. Supstrat se dodaje onom brzinom kojom se troši, a proces traje dok se ne dostignu limitirajuće koncentracije etanola ili se ne potroši neki esencijalni nutrijent. Prednosti ovog tipa procesa su: postizanje visokih prinosa u dobro definisanom vremenu kultivacije (tokom fermentacije se ne dodaju niti odvode ćelije proizvodnog mikroorganizma); visok nivo fleksibilnosti; smanjena je mogućnost za mutaciju proizvodnog mikroorganizma i rizik od infekcije; moguća je optimizacija uslova rasta, produkcione faze kao i starosti ćelija.

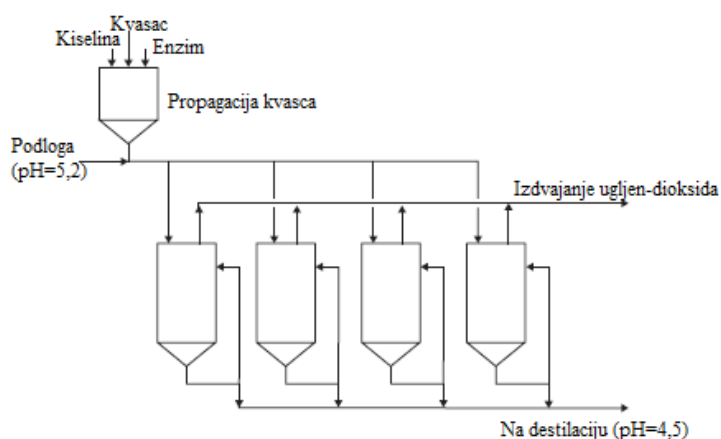
Nedostaci dolivnog postupka su: neproduktivno vreme punjenja, zagrevanja, sterilizacije, hlađenja, pražnjenja i pranja fermentora; viši zahtevi za radnu snagu; viša cena aparata za kompjuterizovanu kontrolu procesa; veći rizik za radnike koji dolaze u kontakt sa patogenim mikroorganizmima i toksičnim produktima; brže habanje i trošenje instrumenata zbog učestane sterilizacije.

Semikontinualni postupak obuhvata takozvane ulazno-izlazne, protočne procese i varijacije cikličnih fermentacija. Jedan deo sadržaja fermentora sa proizvodnim mikroorganizmom se izvodi i dodaje se ista zapremina sveže podloge. Ovaj tip fermentacije se može izvoditi pomoću nekoliko fermentora. Prednosti ovog postupka su: nije potreban sud za inokulum osim na početku rada; ne gubi se vreme na neproduktivne operacije pranja i ponovne sterilizacije; ne zahteva složenu kontrolu. Primenom ovog sistema vreme fermentacije se skraćuje zbog visoke koncentracije i aktivnosti ćelija kvasca. Nedostaci su: povećanje investicija zbog veće zapremine fermentora; visok rizik od kontaminacije i mutacija zbog dužine procesa kultivacije i na kraju procesa se dobija biomasa i proizvod. I pored navedenih nedostataka semikontinualni postupak se često primenjuje u industrijskoj proizvodnji bioetanola.

Kontinualni postupak je tehnološki najinteresantniji zbog toga što se proizvodni mikroorganizam nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta, tako da sve vreme produktivnost etanola raste. Prednosti ovog postupka su: mehanizacija i automatizacija su maksimalno omogućene; zahteva malo radne snage; zahteva manje zapremine fermentora zbog toga što nema neproduktivnog vremena; konstantan kvalitet proizvoda; male su mogućnosti kontakta sa patogenim mikroorganizmima i toksičnim materijama

zbog toga što je poboljšana mehanizacija; manje se troše i oštećuju instrumenti procesom sterilizacije (Mojović i sar., 2007).

Pored izabranog postupka fermentacije, od izuzetnog značaja za efikasnost fermentacije i produktivnost proizvodnje etanola mogu biti određena konstrukciona poboljšanja fermentora radi boljeg prenosa mase i toplote u sistemu, kao i bolje kontrole procesa (Thatipamala i sar., 1996). Da bi se izbegla inhibicija mikroorganizama visokom koncentracijom etanola, ispituje se hibridizacija procesa fermentacije i separacionih tehnika (fermentori združeni sa membranskim postupkom izdvajanja; uvođenje tehnika uklanjanja etanola vakuumom) (Baras i sar., 2002). Iako je ekonomičnost ovih poslednje navedenih tehnika diskutabilna i mora se potvrditi na svakoj pojedinačnoj procesnoj koncepciji, opšte je prihvaćeno da težnja ka združivanju faze ošećerenja i fermentacije skrobnih sirovina vodi ka poboljšanju ukupne ekonomičnosti procesa i sa aspekta potrošnje energije, i sa aspekta ukupne dužine trajanja procesa (Nikolić i sar., 2005). Ovako integrisan proces je poznat i kao SSF proces (simultano ošećerenje i fermentacija – *simultaneous saccharification and fermentation*, engl). Kod pogona za proizvodnju bioetanola većih razmera potrebna je i veća količina kvasca, odnosno proizvodnog mikroorganizma, da bi se izvela energična fermentacija. U takvom postupku se može uvesti i aerobna faza propagacije kvasca koja prethodi fermentaciji. Racionalizacijom postupka, radi bolje efikasnosti moguće je istovremeno odvijati fazu ošećerenja, umnožavanja kvasca i fermentacije – SSYPF (*simultaneous saccharification, propagation and yeast fermentation*, engl) (Mojović i sar., 2007). Ovaj postupak je prikazan na slici 4.11.



Slika 4.11. Uprošćeni dijagram toka alkoholne fermentacije sa suvim mlevenjem, sa propagacijom kvasca i simultanom saharifikacijom i fermentacijom (Drapcho i sar., 2008)

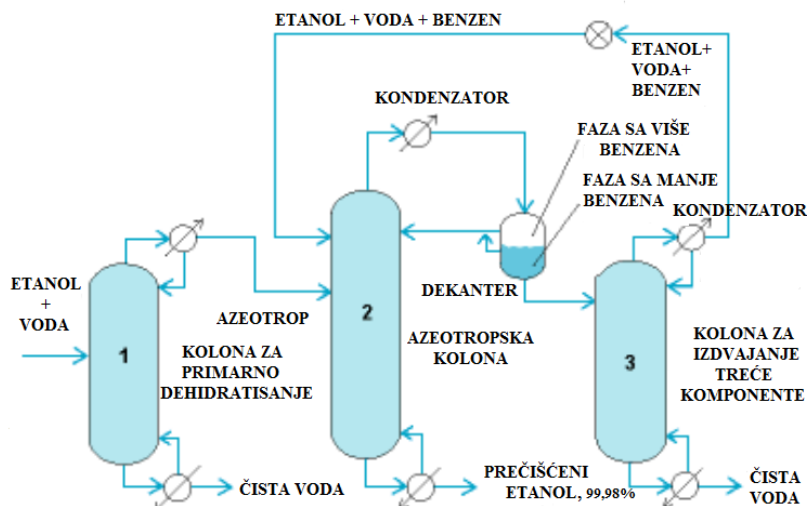
4.4. Izdvajanje proizvoda

Osnovni procesi kojima se etanol izdvaja iz fermentacione podloge nakon fermentacije jesu destilacija i rektifikacija. Ovim postupcima se obično postiže koncentracija etanola od oko 95-96% vol., koja nije prihvatljiva čistoća za korišćenje kao goriva. Etanol i voda grade azeotropsku smešu od 95% etanola i 5% vode zapreminski. Da bi se dobio anhidrovani etanol koji sadrži minimalno 99,5% etilalkohola namenjen za namešavanje sa benzinom, moraju se primeniti posebni postupci.

Postoje dva osnovna tipa tehnoloških postupaka za dobijanje anhidrovanog bioetanola:

1. Azeotropska destilacija i rektifikacija
2. Nedestilacione metode:
 - dehidratacija adsorpcijom;
 - dehidratacija korišćenjem membranske tehnologije ili pervaporacija.

Azeotropska destilacija se koristi za dobijanje čistog, apsolutnog etanola (99,98 vol. %), sa sadržajem vode manjim od 200 mg kg⁻¹ i sadržajem ukupnih nečistoća manjim od 20 mg kg⁻¹. Kako bi se dobio bezvodni etanol (čistoće 99,98%), rafinisani etanol (95-96 vol. %) koji sadrži etanol i vodu se meša sa trećom komponentom, tzv. "*entrainer*" agenasom, kao što su benzen, cikloheksan, dietil etar i *n*-pentan, i tako stvara azeotropsku smešu. Ovom smešom se napaja dehidrataciona kolona, frakcija anhidrovanog etanola se skuplja na dnu i hladi pre skladištenja. Tercijarni azeotrop napušta kolonu na vrhu, kondenzuje se i zatim razdvaja na organsku fazu i vodu u dekanteru (slika 4.12).

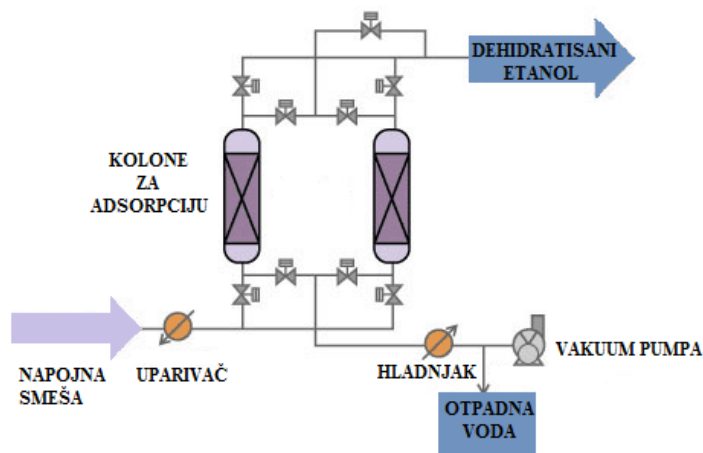


Slika 4.12. Šema postupka dobijanja anhidrovanog bioetanola azeotropskom destilacijom pomoću benzena kao treće komponente

Efikasan sistem za dehidrataciju etanola ima potrošnju od 1-1,5 kg pare po litri anhidrovanog etanola. Postrojenje za dobijanje anhidrovanog etanola je često u savremenim sistemima sastavni deo sistema za destilaciju i rektifikaciju. U tom slučaju nije potrebno ugrađivati posebnu kolonu za koncentrovanje etanola jer tu funkciju može vršiti rektifikaciona kolona (Mojović i sar., 2007).

Procesi destilacije i rektifikacije i daljeg prečišćavanja etanola su ekonomski najnepovoljnije faze u proizvodnji etanola. Zbog toga je značajno da profermentisana podloga koja odlazi na destilaciju ima što je moguće veću koncentraciju etanola. U industrijskoj praksi se najčešće destilacija i rektifikacija izvode u zajedničkom postrojenju kontinualnim tokom. Razvoj destilaciono-rektifikacionih sistema koji je baziran na savremenoj konstrukciji i povezivanju destilacionih kolona, racionalizaciji energije rekuperacijom, kondenzacijom i kompresijom nastalih para, uvođenju termopumpi i savršenijeg kontrolnog sistema omogućava i do 40% energetske uštede u odnosu na potrošnju energije koja u konvencionalnim destilaciono-rektifikacionim postrojenjima iznosi 10-12 MJ l⁻¹ anhidrovanog etanola (Licht, 1999). U proizvodnji etanola iz žitarica, značajna ušteda energije (za oko 10%) se postiže recirkulacijom toplote iz sistema za zagrevanje skrobne sirovine iz faze pripreme supstrata u fazu destilacije i rektifikacije (Thatipamala i sar., 1996).

Dehidracija adsorpcijom se zasniva na korišćenju dehidracionih sredstava za izdvajanje vode iz rafinisanog etanola (95-96 vol %). Danas se za dehidraciju 95% etanola najčešće koriste molekulska sita čije su pore propustljive za vodu ali ne i za etanol. Molekulska sita su najčešće adsorbenti od prirodnih ili sintetičkih zeolita, kalijum-aluminosilikati, ili određeni polimerni materijali. Mogu biti cilindričnog ili sfernog oblika. Molekulska sita imaju pore tačno definisanih dimenzija, što im omogućava da adsorbuju i uklone molekule određenih dimenzija iz smeše koja sadrži i veće molekule. Tako na primer, dehidracija etanola se može uspešno izvesti pomoću molekulskih sita sa prečnikom pora od 3 Å, u čije pore difunduju molekuli vode čiji je prečnik 2,8 Å. Molekuli etanola koji imaju prečnik od 4,4 Å ne mogu da uđu u pore i zato se ne zadržavaju na materijalu (Mojović i sar., 2007). Proces koji se najčešće naziva vibraciona adsorpcija pod pritiskom (*Pressure Swing Adsorption* - PSA) se koristi za dehidraciju 95% etanola molekulskim sitima. Svaka podjedinica ovog procesa se sastoji od dve kolone sa punjenjem (molekulskim sitima). Na slici 4.13. je dat šematski prikaz koji ilustruje funkcionisanje postrojenja sa adsorpcijom pomoću molekulskih sita.

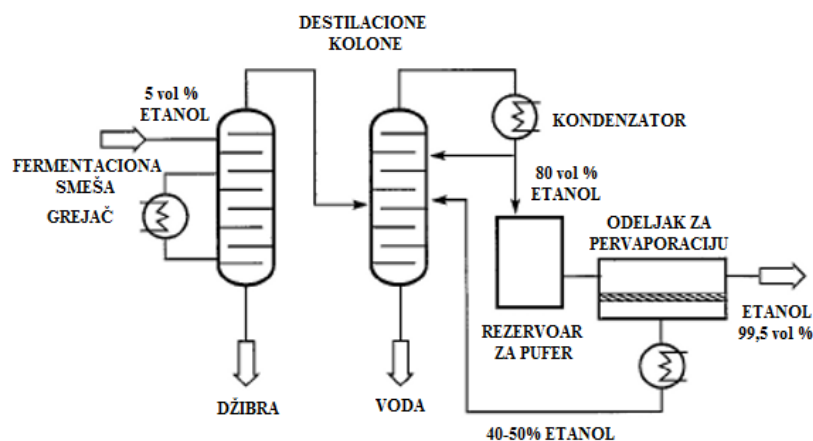


Slika 4.13. Šematski prikaz procesa sa molekulskim sitima

Pored molekulskih sita, mogu se koristiti i drugi čvrsti adsorbenti za adsorpciju vode iz 95% etanola. Celuloza i skrob su se zbog svoje male toplotne adsorpcije pokazali kao pogodni i efikasni adsorbenti. Separaciju smeše etanol-voda prevođenjem pare preko celuloznih ili skrobnih adsorbenata prvi put su izveli Ladisch i Dyck 1979. godine. Od tada su brojne studije pokazale da se u ove svrhe mogu koristiti razni materijali među kojima su kukuruzno brašno i zrna pšenice čije su prednosti niska cena, mogućnost ponovnog korišćenja za fermentaciju ili hranu za životinje, netoksičnost i

biorazgradivost. Pokazalo se da se kukuruzno brašno može koristiti kao veoma efikasno dehidrataciono sredstvo jer se može reciklirati i do 20 puta pre nego što se upotrebi u hrani za životinje (Westgata i Ladisch, 1993).

Dehidratacija pervaporacijom predstavlja tehnologiju za anhidrovanje etanola koja je novijeg datuma. Na slici 4.14. je dat šematski prikaz postrojenja sa spojenim procesima fermentacije, destilacije i izdvajanja bezvodnog etanola pervaporacijom pomoću membranskih filtera.



Slika 4.14. Šematski prikaz integrisanog postrojenja za fermentaciju, destilaciju i pervaporaciju (Baker, 2000)

Pervaporacija se zasniva na selektivnom razdvajanju napojne smeše tečnosti koje se odvija preko membrane. Uklanjanje određenih jedinjenja se postiže parcijalnom razlikom u pritisku između napojne smeše i permeata na različitim stranama membrane. Separacija je funkcija brzine propuštanja komponenta smeše kroz membranu. Različite vrste polimernih membrana dopuštaju adsorpciju različitih hemijskih jedinjenja. Pervaporacija je dvostepeni proces koji se sastoji od isparavanja i prenosa mase kroz membranu. U fazi isparavanja se postiže temperatura nastajanja zasićene pare napojne smeše. U drugoj fazi procesa para difunduje kroz membranu i izdvaja se u vidu permeata.

Na membransku separaciju utiču hemijske i fizičke karakteristike membrane. Membranska separacija je posledica razlika u veličini, obliku, hemijskim svojstvima i naelektrisanju supstanci koje se razdvajaju. Kroz mikroporozne membrane se separacija vrši na osnovu razlika u veličini, obliku i naelektrisanju, dok se kod neporoznih membrana separacija zasniva na difuziji. Membrane od neorganskih materija se

proizvode od keramike, metala i stakla. Zbog svoje čvrstine, keramički mikrofilteri mogu da podnesu veće protoke od polimernih membrana. Keramičke membrane su veoma otporne na hemikalije za čišćenje te se mogu sterilisati više puta. Mogu se koristiti i do deset godina za razliku o polimernih membrana koje traju između 1-4 godine. Keramičke membrane su lako lomljive i skuplje od polimernih. Membrane za pervaporaciju se najčešće prave od kompozitnih materijala (Thoma i sar., 1998). Za separaciju tečnih smeša pervaporacijom veliki značaj imaju zeolitske membrane, koje se nanose na neorganske nosače čija priroda i struktura utiču na membrane. Najčešće se kao nosač koristi sinterovani Al_2O_3 .

Pervaporator se sastoji od više modula semipermeabilnih membrana na bazi polimera poliviniletanola. Etanol (95 vol. %) koji je potrebno anhidrovati se prvo zagreje do $60^{\circ}C$, a zatim uvodi u membranski modul pervaporatora. Izdvajanje vode u pervaporatoru se vrši pomoću vakuuma manjeg od 1 kPa. Ukupna energija koja se potroši po procesu predstavlja sumu entalpija isparavanja i kondenzacije. U izdvojenoj vodi zaostaje oko 23% etanola koji se može reciklirati do faze destilacije i rektifikacije i na taj način izdvojiti. Da bi se proizvelo 1000 l anhidrovanog etanola, potrebno je utrošiti oko 135 kg pare (200 kPa), $10\ m^3$ vode za hlađenje ($20^{\circ}C$) i 15 kWh električne energije.

4.5. Sporedni proizvodi

Osnovni sporedni proizvodi u proizvodnji etanola iz ugljenohidratnih sirovina su džibra i ugljen-dioksid.

Ugljen-diksid čistoće 99,00-99,50% može se dobiti u hermetički zatvorenim fermentorima. Kao primese u ugljen-dioksidu mogu biti: etanol (0,4 – 0,8 masenih % na CO_2), estri (0,03 – 0,4% na CO_2), kiseline (0,08 – 0,09% na CO_2) i tragovi aldehida. Posle veoma jednostavnog čišćenja može se dobiti skoro hemijski čist ugljen-dioksid. Kritična temperatura za komprimovanje CO_2 je $31,1^{\circ}C$. Pri temperaturi $12-15^{\circ}C$ potrebno je obezbediti nadpritisak od 60-65 bar da bi se ugljen-dioksid preveo u tečno stanje. Kritična temperatura za transformaciju ugljen- dioksida u čvrsto stanje je $56,6^{\circ}C$.

Ugljen-dioksid sadrži vazduh, vodenu paru, etanol, organske kiseline, estre i aldehide. Pri povišenom sadržaju vazduha narušava se rad postrojenja za obradu ugljen-dioksida, a vodena para i navedene primese mogu izazvati koroziju ovih uređaja. Sastav

ugljen-dioksida zavisi od temperature fermentacije i od sadržaja ugljenih hidrata u fermentacionoj podlozi.

Pri diskontinualnom postupku fermentacije za vreme punjenja fermentora ugljen-dioksid se meša sa vazduhom i zbog toga se može iskoristiti samo 70% od ukupne količine nastale tokom fermentacije. Kod kontinualnog procesa fermentacije, ugljen-dioksid se ne meša sa vazduhom i može se u potpunosti iskoristiti.

Uklanjanje organskih primesa iz ugljen-dioksida izvodi se adsorpcionim i adsorpcionim metodama ili kombinovanjem ovih metoda. Prime se mogu ukloniti adsorpcijom na aktivnom uglju, silikagelu i zeolitu tipa NaA. Najveća količina vlage može se ukloniti zeolitom NaA. Za sušenje ugljen-dioksida primenjuje se vodeni rastvor sumporne kiseline, kalcijum-hlorid, adsorpcija sa silikagelom. U savremenim tehnologijama obrade ugljen-dioksida primenjuje se dvostepeni postupak prečišćavanja ugljen-dioksida. U prvom stadijumu, on se podvrgava čišćenju adsorpcijom sa aktivnim ugljem, zatim sledi adsorpciono čišćenje i sušenje u adsorberima sa silikagelom, a nakon toga potpuno sušenje u adsorberima sa zeolitom.

Prečišćen, osušeni komprimovan ugljen-dioksid se koristi u prehrambenoj industriji u procesima gaziranja bezalkoholnih napitaka, penušavih vina, šampanjca i mineralnih voda. Poslednjih godina primena ugljen-dioksida se značajno proširila u obradi metala rezanjem, u zavarivanju i livenju.

4.5.1. Suva kukuruzna džibra

Od svih sporednih proizvoda industrije etanola suva džibra sa rastvorenim materijama (skraćeno SDŽSRM ili dalje u tekstu suva kukuruzna džibra) predstavlja trenutno najatraktivniji sporedni proizvod industrije bioetanola zbog njene hranljive vrednosti i mogućnosti upotrebe kao komponente u smešama koncentrata za ishranu životinja (Semenčenko i sar., 2013.a). Industrija alkoholnih pića takođe proizvodi suhu džibru sa rastvorenim materijama (manje od 1% od ukupne proizvodnje suve kukuruzne džibre u SAD), ali je ona često tamnije boje, sastav joj više varira i sadrži manje svarljivih hranljivih materija od suve kukuruzne džibre iz proizvodnje bioetanola (US Grains Council, 2011). Na slici 4.15. prikazani su uzorci suve džibre sa rastvorenim materijama.



Slika 4.15. Uzorci suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama, posle sušenja (levo) i posle mlevenja (desno)

Tokom proizvodnje bioetanola, skrob iz zrna se troši i prevodi u alkohol i ugljen-dioksid. Kao posledica trošenja skroba, koncentracija preostalih hranljivih materija se uvećava približno tri puta (Spiehs i sar., 2002). Suva džibra sa rastvorljivim materijama sadrži veći procenat proteina, vlakana i masti nego kukuruzno zrno (Liu i sar., 2011). Suva kukuruzna džibra ne može se koristiti kao kompletno hranivo u ishrani domaćih životinja (U.S. Grains Council, 2012). Kao hranivo sadrži srednji nivo energije za monogastrične životinje, ali visok sadržaj za preživare. Dobar je izvor vitamina B i kritičnih minerala, posebno fosfora i natrijuma, i aminokiseline metionina, a oskudan u lizinu (Bekrić, 1999).

Dok suvo mlevene frakcije endosperma nekih hibrida kukuruza sadrže i do 18,7% proteina, suva kukuruzna džibra proseku sadrži 28-30% proteina (Singh i sar., 2002). Usled rasta cena hrane za životinje, mogućnost da se suva kukuruzna džibra dodaje hranivima u većem procentu nego što je bilo praktikovano do sada ili da se koristi kao alternativna hrana za životinje, postala je značajna tema za razmatranje (Beckman i sar., 2011; Au i sar., 2010). Smanjeni unos skroba povećava potrošnju svarljivih vlakana i pomaže sprečavanje pojave subakutne acidoze buraga kod preživara (Ham i sar., 1994; Klopfenstein i sar., 1997; Klopfenstein i sar., 2008). Osim što predstavlja dobar izvor proteina za ishranu mladunaca i odraslih životinja, neke studije su pokazale da suva kukuruzna džibra pruža veću energiju za rast od kukuruzne prekrupe (Ham i sar., 1994; Klopfenstein i sar., 1997; Nuez Ortin i sar., 2009).

Fizičke i hemijske karakteristike suve kukuruzne džibre variraju u zavisnosti od sirovine i mogu uticati na kvalitet i senzorne karakteristike hraniva, što može loše da se odrazi na prinos životinja koje se njome hrane, kao i na tržišnu cenu koja se formira na osnovu nutritivnih karakteristika, pre svega sadržaja sirovih proteina (Mojović i sar., 2007; US Grains Council, 2011). S obzirom da je suva džibra nusprodukt procesa proizvodnje etanola, faktori kao što su izbor zrna i hibrida, tip procesa fermentacije

(kontinualni ili šaržni) kao i temperatura i period sušenja mogu uticati na hranljiva i fizička svojstva suve džibre, kao i na relativno nizak sadržaj lizina i cistina u odnosu na ostale aminokiseline, što je posledica Majlardove reakcije. Proces sušenja ima veliki uticaj na boju i ukus suve kukuruzne džibre (svetlija boja je uvek znak boljeg kvaliteta) (U.S. Grains Council, 2011).

U proseku, oko polovine sadržaja aminokiselina u suvoj džibri potiče iz kvasca, jedino je u slučaju lizina, u kome je kukuruz siromašan, taj udeo mnogo veći (Belyea i sar., 2004) (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Sadržaj esencijalnih aminokiselina (%), računato na suhu materiju) u proteinima kukuruza, kvasca i suve kukuruzne džibre

Aminokiselina	Kvasac	Kukuruz	Suva kukuruzna džibra
Arginin	2,35	0,54	1,05
Histidin	1,17	0,25	0,70
Izoleucin	2,37	0,39	1,52
Leucin	3,45	1,12	2,43
Lizin	3,32	0,24	0,77
Metionin	0,79	0,21	0,54
Fenilalanin	1,96	0,49	1,64
Treonin	2,27	0,39	1,01
Triptofan	0,55	0,09	0,19
Tirozin	1,60	0,43	0,76
Valin	2,52	0,51	1,63

Istraživanja su pokazala da ne postoji značajna korelaciona zavisnost između sadržaja pojedinih hranljivih materija u suvoj džibri. Tako je, na primer, sadržaj proteina veoma promenljiv, zavisi prvenstveno od odnosa između količine i sastava vlažne džibre koji se menja od šarže do šarže i uglavnom nije dovoljno standardizovan i kontrolisan. Skoro svi proteini kukuruza zaostaju u suvoj džibri, jer kvasac koji se koristi za fermentaciju ne sadrži proteolitičke enzime koji mogu da ih razgrade (Belyea i sar., 2004).

Boja suve džibre sa rastvorenim materijama varira od bledožute do tamnosmeđe. Razlike u boji mogu biti posledica: prirodne boje sirovog zrna koje se koristi, količine rastvorljivih materija koje se dodaju vlažnoj džibri pre sušenja, vremena i temperature sušenja (U.S. Grains Council, 2011). Nekoliko studija je pokazalo da se pigmentacija žumanca i kože živine popravljaju dodatkom kukuruzne džibre u ishrani.

Trenutno nema dovoljno podataka o koncentraciji ksantofila u džibri, ali početna istraživanja ukazuju na to da ona može varirati od veoma niske (veoma tamna džibra) do oko 40-50 ppm (svetla – zlatnožuta džibra). Iako je koncentracija ksantofila znatno manja nego kod kukuruznog griza (180 do 200 ppm), ona značajno utiče na ishranu živine, tako da nije potrebno dodavati veštačke pigmente kako bi se postigla poželjna pigmentacija. To može značajno uticati na smanjenje troškova gajenja živine (US Grains Council, 2012).

Miris kvalitetne suve džibre sa rastvorenim materijama je slatkast i blago se oseća na alkohol, dok se pregrejan proizvod oseća na zagorelo i dim. Veličina i uniformnost čestica hraniva su od velikog značaja u proizvodnji hrane za životinje jer utiču na: svarljivost nutrijenata, efikasnost mešanja, način doziranja, kvalitet peleta, lakoću rukovanja tokom transporta, pojavu čira na želucu kod svinja (verovatnoća pojave ovog oboljenja se povećava sa smanjenjem veličine čestica). Optimalna veličina čestica hrane za svinje i živinu kreće se od 600 do 800 mikrona (μm) (U.S. Grains Council, 2011).

Stabilnost ovog proizvoda najviše zavisi od procenta vlage koji se u proseku kreće od 10-12%. Rok trajanja je nekoliko meseci, osim ako procenat vlage premaši 12-13%.

Suva kukuruzna džibra ima različite mogućnosti primene počev od hrane za životinje i pekarskih proizvoda do proizvodnje ćumura (Mussatto i sar., 2006). Trenutno ima značajnu primenu jedino u ishrani domaćih životinja (Liu i sar., 2011).

U svom istraživanju Westcott (2007) je koristio faktore konverzije kukuruza do suve džibre sa rastvorenim materijama namenjene ishrani različitih vrsta životinja kako bi se predvidela potrebna obradiva površina za gajenje kukuruza u uslovima naglog razvoja biogoriva. Povećanjem proizvodnje biogoriva na tržištu se javljaju i značajno veće količine suve kukuruzne džibre kao sporednog proizvoda što je dovelo do razmatranja mogućnosti primene ovog proizvoda u ishrani životinja. Suva džibra se ne može jednostavno primenjivati kao kompletna smeša za ishranu životinja, već se mora voditi računa o složenosti formulacije hraniva koja su određena potrebama pojedinih vrsta životinja za adekvatnom količinom energije, proteina i drugih hranljivih materija, kao i cenom komponenata smeše (St. Pierre i sar., 1987).

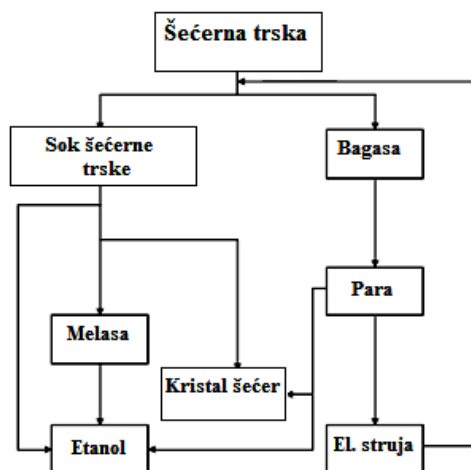
Tokom proteklih decenija, suva kukuruzna džibra je uglavnom predstavljala jeftiniju alternativu (na primer u odnosu na sojino brašno ili ureu) kao izvor proteina za ishranu životinja (Klopfenstein, 1996). Međutim, u poslednje vreme, suva kukuruzna

džibra se sve više koristi i zbog svoje energetske vrednosti. Sa porastom cena kukuruza i sve većim prisustvom suve džibre na tržištu, postalo je isplativije korišćenje ovog energetski vrednog hraniva jer je ono znatno jeftinije od kukuruza.

Opšti zaključak je da se suva kukuruzna džibra sve više koristi kao proteinsko i energetski vredno hranivo za pripremu potpunih i koncentrovanih smeša za ishranu životinja. Sadržaj metaboličke energije u suvoj kukuruznoj džibri je $14,81 \text{ MJ kg}^{-1}$ dok je prosečan sadržaj metaboličke energije u zrnju kukuruza za živinu $14,3 \text{ MJ kg}^{-1}$ a za svinje $13,9 \text{ MJ kg}^{-1}$ – tablične vrednosti (Niemić i sar., 2013; Đorđević i Dinić, 2006) Upotreba suve kukuruzne džibre pozitivno utiče na razvoj proizvodnje biogoriva s obzirom da predstavlja drugi po visini prihoda od ove industrije (iznosi oko 10-20% od ukupnog prihoda), posle samog bioetanola (Beckman, 2011). Ako bi se proizvela dovoljno velika količina bioetanola, postojala bi mogućnost da niske veleprodajne cene suve kukuruzne džibre u odnosu na kukuruz ograniče razvoj proizvodnje biogoriva. Međutim, za suhu kukuruznu džibru sa rastvorenim materijama danas već postoji razvijeno tržište a cena je povezana sa cenom kukuruza, što će se nastaviti i u budućnosti.

4.6. Proizvodnja bioetanola iz šećernih sirovina

Brazil je vodeća zemlja u proizvodnji etanola iz šećernih sirovina. Za proizvodnju se koriste difuzioni sok i melasa iz šećerne trske (tabele) (Drapcho i sar., 2008). Najčešće se postrojenja za proizvodnju etanola grade u blizini postrojenja za preradu šećerne repe ili trske, ili kao njihov deo. Na blok dijagramu je dat prikaz postrojenja i operacija tokom procesa prerade šećerne trske (slika 4.16).



Slika 4.16. Blok dijagram integriranog postrojenja za preradu šećernih sirovina i proizvodnju etanola (Drapcho i sar., 2008)

Sok se ekstrahuje iz šećerne trske ceđenjem (na valjcima) ili difuzijom (u difuzeru). Deo soka se koristi za proizvodnju šećera a ostatak za dobijanje etanola. Melasa, koja predstavlja nusproizvod male vrednosti, takođe se koristi u proizvodnji etanola (tabela 4.3). Čvrsti ostatak iz ekstrakcije, koji se označava kao *bagasse*, sagoreva se da bi se dobila energija za upotrebu u postrojenju.

U Brazilu se etanol najčešće dobija fermentacijom iz soka šećerne trske ili smeše melase i soka šećerne trske. Pre ulaska u fermentor, rastvor šećera se mora prečistiti i pasterezovati. Prečišćavanje najčešće uključuje tretiranje krečom, zagrevanje i potom dekantovanje, slično kao kod proizvodnje šećera. Pasterizacija uključuje zagrevanje i brzo hlađenje. Hlađenje se sastoji od dve faze. U prvoj fazi se vrući rastvor šećera provedi kroz razmenjivač toplote u protivstrujnom toku u hladni rastvor. Na kraju ove faze vrući rastvor se ohladi na oko 60°C. U drugoj fazi se rastvor šećera dalje ohladi do 30°C, pri čemu se voda koristi kao rashladni fluid. Koncentracija šećera se obično podešava na približno 19° Brix. Stepen Brix (°Bx) je gruba mera za sadržaj šećera u melasi. To je po definiciji mera koja pokazuje koliki bi sadržaj šećera bio u tečnosti kada bi sve rastvorene materije bile šećeri. Ova mera je bila u upotrebi pre nego što su uvedeni savremeni instrumenti kao što je HPLC, i još uvek se negde koristi. Kao što je prikazano u tabeli 4.3, melasa iz šećerne trske u proseku ima vrednost Brix-a oko 80° i sadrži oko 46 masenih % šećera.

U tabelama 4.2. i 4.3. prikazane su karakteristike soka i melase šećerne repe i šećerne trske.

Tabela 4.2. Sastav soka šećerne trske i šećerne repe

Komponenta	Koncentracija, g/100g	
	Sok šećerne trske	Sok šećerne repe
Suva materija	13,7	17,3
Saharoza	12	16,5
Rafinoza		0,07
Monosaharidi	0,63	0,15
Polisaharidi	0,028	0,019
Laktati	0,016	
Acetati	0,035	
Sulfati	0,039	0,02
Fosfati	0,033	0,047
Nitrati		0,015
Nitriti		0,005
Akonitat	0,09	
K	0,11	0,125
Na	0,005	0,015
Cl		0,003
Ca	0,04	
Mg	0,028	
Ukupni N		0,105
Betain		0,046
Aminokiselinski N		0,026
Amonijačni N		0,006
Amidni N		0,011

Tabela 4.3. Karakteristike melase šećerne trske i šećerne repe

	Melasa šećerne trske	Melasa šećerne repe
Brix	79,5	79,5
Ukupna suva materija, %	75,0	77,0
Relativna gustina	1,41	1,41
Ukupni šećeri, %	46,0	48,0
Ukupni proteini, %	3,0	6,0
Betatotni ekstrakt, %	63,0	62,0
Pepeo, %	8,1	8,7
Ca, %	0,8	0,2
P, %	0,08	0,03
K, %	2,4	4,7
Na, %	0,2	1,0
Cl, %	1,4	0,9
S, %	0,5	0,5
Elementi u tragovima		
Cu, mg·kg ⁻¹	36	13
Fe, mg·kg ⁻¹	249	117
Mn, mg·kg ⁻¹	35	10
Zn, mg·kg ⁻¹	13	40
Vitamini		
Biotin, mg·kg ⁻¹	0,36	0,46
Holin, mg·kg ⁻¹	745	716
Pantotenska kiselina, mg·kg ⁻¹	21,0	7,0
Riboflavin, mg·kg ⁻¹	1,8	1,4
Tiamin, mg·kg ⁻¹	0,9	-

Fermentacija može biti šaržna ili kontinualna. U Brazilu, približno 70% postrojenja za proizvodnju etanola primenjuju šaržni postupak. Melle-Boinot proces,

koji je razvijen tokom tridesetih godina 20. veka, najčešće se primenjuje u Brazilu. Osnovna karakteristika ovog procesa je potpuno recirkulisanje kvasca, obično primenom centrifuge. Kontinualni proces sa recirkulisanjem ćelija razvijen je osamdesetih godina dvadesetog veka s ciljem da zameni šaržni postupak u velikom broju postrojenja za etanol.

U tabeli 4.4. su prikazani najvažniji parametri šaržne fermentacije.

Tabela 4.4. Najvažniji parametri procesa šaržne fermentacije za proizvodnju etanola iz soka šećerne trske i melase

Procesni parametar	Vrednost
Gustina ćelija	8-17% (w/v)
Temperatura	33-35°C; 32°C
Koncentracija etanola	8-11%(v/v); 7-10%(v/v)
Vreme fermentacije	6-10h; 4-12h
Prinos etanola	90-92% od teorijskog

Obično se pre vraćanja u fermentor recirkulisane ćelije razblažuju vodom, i dodaje se sumporna kiselina do pH 2,5 ili niže (pH 2) ako postoji bakterijska kontaminacija. Veoma velika gustina ćelija omogućava smanjeni rast, visok prinos etanola i veoma kratko vreme fermentacije. Kvasac se može recirkulisati do 3 puta dnevno i do 200 dana. Često je potreban izvor azota tokom procesa fermentacije. Najčešće korišćeni izvor azota je urea. U fermentaciji sa melasom šećerne trske trebalo bi izbegavati amonijum sulfat, koji se često koristi kao izvor azota u industrijskim fermentacijama, jer može stvarati kamenac u vidu kalcijum sulfata. Još jedan često korišćeni izvor azota u industrijskoj fermentaciji - tečni amonijak – takođe treba izbegavati zato što podiže pH, što podstiče razvoj bakterija.

U Brazilu se oko 55% požnjevene šećerne trske koristi za proizvodnju etanola, a ostatak za proizvodnju šećera. Po jednom hektaru zemljišta se proizvede između 81–82 t šećerne trske i oko 7000 l etanola. Ukupni troškovi proizvodnje etanola u Brazilu tokom 2005. godine iznosili su 1,10 \$gal⁻¹ (0,291\$I⁻¹), uz varijabilne troškove od 0,89 \$gal⁻¹ (0,235 \$I⁻¹) i fiksne troškove od 0,21 \$gal⁻¹ (0,055 \$I⁻¹) (Drapcho i sar., 2008).

Upotreba šećerne repe u proizvodnji etanola nije toliko rasprostranjena kao upotreba šećerne trske. Zbog toga i nema detaljnijih podataka vezanih za ovu proizvodnju. Interesovanje za šećernu repu u proizvodnji etanola nedavno je počelo da raste, posebno u Evropskoj uniji i Japanu. Zbog sličnosti u hemijskom sastavu šećernih rastvora izolovanih iz šećerne trske i šećerne repe, očekuje se da će se sok šećerne repe

uskoro koristiti za alkoholnu fermentaciju pomoću industrijskih kvasaca sa velikom efikasnošću. Pokazalo se da se pomoću flokulisućeg soja kvasca *S. cerevisiae* IR2, imobilisanog na lufa sunderu iz sirovog soka šećerne repe koji sadrži 16,5 masenih % saharoze, može proizvesti 9,5% (v/v) etanola nakon 15 sati fermentacije, bez podešavanja pH i dodavanja nutrijenata. Procenjeno je da bi se u EU, etanol mogao proizvoditi iz šećerne repe u prinosu od približno 5000 l ha⁻¹ površine.

4.7. Proizvodnja bioetanol iz lignoceluloznih sirovina

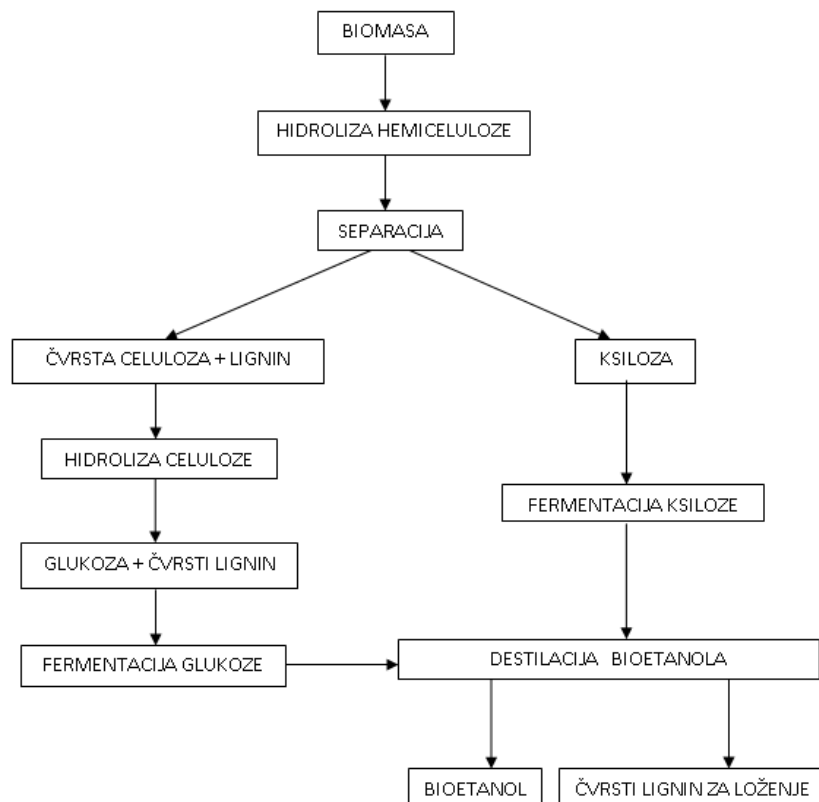
U zavisnosti od vrste sirovine, za dobijanje bioetanol iz lignoceluloznog materijala primenjuju se različiti postupci konverzije, što je prikazano u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Postupci za dobijanje bioetanol iz različitih lignoceluloznih sirovina

Sirovina	Postupak
Drvo	Kiselinska hidroliza + fermentacija
Drvo	Enzimaska hidroliza + fermentacija
Slama	Kiselinska hidroliza + fermentacija
Slama	Enzimaska hidroliza + fermentacija
Pšenica	Sladovanje + fermentacija
Šećerna trska	Fermentacija
Šećerna repa	Fermentacija
Kukuruz (zrno)	Fermentacija
Kukuruz (stabljika)	Kiselinska hidroliza + fermentacija
Sirak	Fermentacija

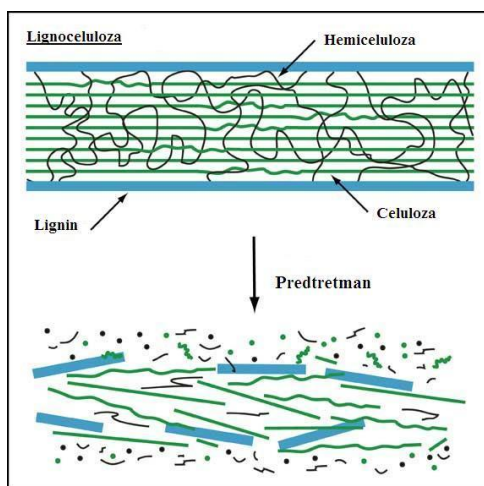
Prethodna priprema lignocelulozne biomase

Proces proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina sastoji se od četiri faze: 1) predtretman, 2) hidroliza, 3) fermentacija i 4) razdvajanje i prečišćavanje bioetanol. Šematski prikaz procesa proizvodnje bioetanol iz lignocelulozne biomase dat je na slici 4.17. (Balat i Balat, 2009).



Slika 4.17. Šematski prikaz proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase

Prilikom proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase zbog njene složene strukture prethodna priprema sirovine je od izuzetnog značaja (Semenčenko i sar., 2011). Mikroorganizmi ne mogu da fermentišu lignin, koji je sastavna komponenta lignocelulozne sirovine pored celuloze i hemiceluloze. Strukturu lignoceluloznog kompleksa čini matrica od celuloze i lignina koja je povezana hemiceluloznim lancima (slika 4.18).



Slika 4.18. Uticaj predtretmana na strukturu lignocelulozne biomase

Tokom predtretmana neophodno je razložiti matricu kako bi se smanjio stepen kristaliničnosti celuloze i povećala frakcija amorfne celuloze koja je najpogodnija za enzimsku reakciju (Sanchez i Cardona, 2008). Predtretmanom se celuloza i hemiceluloza izdvajaju od lignina, a zatim se njihovom hidrolizom prevode u fermentabilne šećere (heksoze i pentoze). Hidrolizu treba voditi pod uslovima pri kojima ne dolazi do izdvajanja jedinjenja koja bi mogla da inhibiraju fermentaciju. Na hidrolizu celuloze utiče poroznost površine (dostupna površina) lignoceluloznog materijala i osnovni cilj predtretmana je razdvajanje lignina i celuloze, smanjenje kristaliničnosti celuloze i povećanje poroznosti materijala.

Lignin, koji se razdvoji od celuloze i hemiceluloze, može se direktno spaljivati i koristiti kao gorivo, na primer za zagrevanje domaćinstava, ili se može efikasno prevesti u sintetički gas (CO_2 , CO i H_2) procesom termičke gasifikacije i tako koristiti kao dodatni izvor energije.

Predtretmanom lignocelulozna biomasa se omekšava i u velikoj meri se razaraju ćelijske strukture čime se povećava prinos u procesu hidrolize. Uspešan predtretman mora da ispuni sledeće zahteve: 1) da pospeši formiranje šećera ili omogući njihovo nastajanje tokom hidrolize, 2) izbegne razlaganje ili gubitak ugljenih hidrata, 3) da onemogući nastajanje nusprodukata koji bi mogli da inhibiraju procese hidrolize i fermentacije i 4) da bude ekonomski isplativ. Hidrolizom bez predtretmana dobijaju se prinosi najčešće manji od 20%, dok sa predtretmanom prinos može biti i preko 90% (Lynd, 1996). Predtretman lignocelulozne biomase može se vršiti različitim metodama, od kojih su najznačajnije: fizičke, fizičko-hemijske, hemijske i biološke.

Fizičke metode

Otpadni materijali se mogu usitniti kombinacijom lomljenja, drobljenja i mlevenja kako bi se smanjila kristaliničnost celuloze. Time se enzimu celulazi pospešuje pristup što većoj površini lignoceluloznog kompleksa, čime se povećava stepen konverzije celuloze. U fizičke metode predtretmana ubrajaju se: mehaničko sitnjenje, piroliza i radijacija. Iako se mehaničkim metodama predtretmana povećava efikasnost enzimske hidrolize celuloze, osnovni nedostatak ovih postupaka je veliki utrošak energije i velika kapitalna ulaganja (Ghosh i Ghose, 2003). Piroliza je takođe ispitivana kao jedna od metoda za predtretman lignoceluloznih sirovina jer se celuloza ubrzano razgrađuje pod uticajem visoke temperature (Sanchez i Cardona, 2008).

Fizičko-hemijske metode

Fizičko-hemijske metode za prethodnu pripremu sirovina su znatno efektivnije od fizičkih. U fizičko-hemijske metode spadaju: eksplozija pod uticajem vodene pare, predtretman toplom vodom, eksplozija u prisustvu amonijaka i eksplozija u prisustvu CO₂. Od ovih metoda je najznačajnija eksplozija pod uticajem vodene pare. U toku ovog postupka, primenom zasićene pare pod visokim pritiskom dolazi do reakcije autohidrolize u kojoj se deo celuloze i lignina prevodi u rastvorljive oligomere. Faktori koji utiču na predtretman parnom eksplozijom su: vreme zadržavanja, temperatura, veličina čestica biomase i sadržaj vlage. U nekim slučajevima (na primer biljni otpad), nije poželjna upotreba veoma sitnih čestica zbog ekonomičnosti (Ballesteros i sar., 2002). Ovaj metod se smatra jednim od najisplativijih za tvrdo drvo (topola, hrast, breza i javor) i poljoprivredne ostatke, ali je manje efikasan za meko drvo (bor i kedar). Shahbazi i sar., (2005) predložili su razdvajanje ovog postupka za meko drvo na parnu eksploziju i alkalnu delignifikaciju u cilju dobijanja etanola i nusproizvoda. Soderstrom i sar., (2003) predložili su dvostepeni parni predtretman impregniranja mekog drveta razblaženom kiselinom koja uključuje delimičnu hidrolizu celuloze u drugom stepenu. Prema ovim autorima, predtretmanom se omogućava značajno povećanje prinosa proizvedenog bioetanola.

Jedan od metoda koji najviše obećava je predtretman tečnom vrelom vodom (eng. *liquid hot water* – LHW) ili termohidroliza. Laser i sar., (2002) naglašavaju da pod optimalnim uslovima, ova metoda daje slične rezultate kao predtretman razblaženom kiselinom, ali bez dodatka kiseline i nastajanja proizvoda neutralizacije. Takođe, ovom metodom se povećava prinos izdvojenih pentoza bez nastajanja inhibitora (Ogier i sar., 1999). Negro i sar., (2003) uporedili su parnu eksploziju sa

LHW predtretmanom za biomasu topole, pri čemu je ovaj drugi pokazao bolje rezultate na temperaturi od 210°C u trajanju od 4 minuta.

Od fizičko-hemijskih metoda, važno je pomenuti eksploziju vlakana amonijakom (eng. *ammonia fiberexplosion* – AFEX), koja je u osnovi slična parnoj eksploziji. Slično parnoj eksploziji i AFEX-u, eksplozivna dekompozicija u prisustvi CO₂ ima isti princip, ali su prinosi relativno niski (Sun i Cheng, 2002).

Hemijske metode

U hemijskim predtretmanima koriste se razni hemijski agensi kao što su ozon, kiseline, alkalije, peroksidi i organski rastvarači. Najčešće se primenjuju neorganske kiseline kao što su sumporna i hlorovodonična. Postupak hidrolize razblaženom sumpornom kiselinom je uspešno razvijen s obzirom da se mogu postići veliki prinosi reakcije čime se znatno pospešuje sledeći proces hidrolize celuloze. Međutim, troškovi predtretmana razblaženom kiselinom su viši nego kod parne eksplozije ili AFEX-a, zbog toga što je pri konstrukciji reaktora za ovu vrstu predtretmana neophodno koristiti materijale otporne na koroziju i povišeni pritisak (Sun i Cheng, 2002).

Biološke metode

Biološki predtretmani zahtevaju mali utrošak energije i blage reakcione uslove. Međutim, većina ovih procesa je suviše spora, traje od nekoliko dana do nekoliko nedelja, zbog čega je primena na industrijskom nivou ograničena. U ovim postupcima se mogu koristiti različiti mikroorganizmi koji razgrađuju lignoceluloznu biomasu: gljive, plesni i bakterije. Mnoge bele plesni razgrađuju lignin i zbog toga se koriste za proizvodnju ligninaza i razgradnju lignoceluloznog kompleksa. U patentu koji se odnosi na razgradnju lignina u procesu proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase, Zhang je koristio gljivu *Phanerochaete chrysosporum* (Zhang, 2006). Šema ovog procesa predstavlja odvojenu fermentaciju pentoza i heksoza. Jedan od glavnih problema koji se javljaju u toku procesa predtretmana i hidrolize lignocelulozne biomase jeste promenljivost u sadržaju lignina i hemiceluloze. Na njihov sadržaj utiču: vrsta biljke iz koje je uzeta lignocelulozna biomasa, starost useva, primenjene agrotehničke mere itd. Novi trendovi za poboljšanje predtretmana lignoceluloznih sirovina takođe uključuju i stvaranje genetički modifikovanih biljaka sa većim sadržajem ugljenih hidrata ili takvih da omoguće predtretman u blažim uslovima ili upotrebom hemicelulaza (Sanchez i Cardona, 2008).

Uklanjanje toksičnih materija iz lignoceluloznih hidrolizata

Tokom predtretmana i hidrolize lignocelulozne biomase, osim fermentabilnih šećera, nastaju i neka jedinjenja koja mogu da inhibiraju fermentaciju. Inhibitorne supstance nastaju kao rezultat hidrolize jedinjenja ekstrakata, organskih kiselina koje se esterifikuju sa hemicelulozom (sirćetna, mravlja, glukuronska, galakturonska) i rastvorenih fenolnih jedinjenja. Inhibitori takođe nastaju i razgradnjom rastvorljivih šećera (furfural i hidroksimetilfurfural - HMF) i lignina (cimetaldehid, *p*-hidroksibenzaldehid, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid) i kao proizvod korozije (metalni joni) (Lynd, 1996). Iz ovih razloga je, u zavisnosti od vrste predtretmana i hidrolize, potrebno izvršiti uklanjanje toksina iz toka lignoceluloznog hidrolizata koji ulazi u fermentor. Metode detoksikacije mogu biti fizičke, hemijske ili biološke. Ove metode se ne mogu direktno porediti zbog različitog stepena neutralizacije inhibitora. Pored toga, mikroorganizmi koji se koriste u procesu fermentacije imaju različit stepen tolerancije na inhibitore.

Hidroliza celuloze

Da bi se izvršila fermentacija lignoceluloznih sirovina, neophodno je da se celuloza razloži do glukoze (saharifikacija) korišćenjem kiselina ili enzima. Hidroliza lignocelulozne biomase posle koje sledi fermentacija, mnogo je komplikovanija od obične hidrolize šećera. Za izvođenje faze hidrolize lignoceluloznih sirovina mogu se koristiti kiselinski i enzimski postupci ili njihova kombinacija (Mojović i sar., 2009).

Hidroliza kiselinama

Hidroliza u prisustvu kiselina je jedna od najstarijih i najčešće primenjivanih tehnologija za prevođenje lignoceluloznog kompleksa u fermentabilne šećere. Postoje dva tipa procesa kiselinske hidrolize: hidroliza sa razblaženom i koncentrovanom kiselinom. Ako se koristi razblažena kiselina (H_2SO_4 i HCl) na temperaturi između 200–400°C, potrebna je koncentracija kiseline od 1,5% da bi došlo do hidrolize kristalne celuloze, međutim, pod ovim uslovima dolazi do razlaganja glukoze u HMF i ostale neželjene proizvode. Na sličan način, ksiloza se razlaže na furfural i druge komponente. Tokom dvostepenog režima, prvi stepen se odvija pod blagim uslovima (190°C, 0,7% kiseline, 3 min) da bi se izdvojile pentoze, dok se u drugom stepenu čvrsti supstrat podvrgava oštrijim uslovima (215°C, 0,4% kiseline, 3 min) da bi se izdvojile heksoze. Na ovaj način, dobija se prinos od 50% glukoze (Hamelinck i sar., 2005). U drugoj varijanti kiselinske hidrolize koristi se ekstremno niska koncentracija kiseline i

visoka temperatura tokom šaržnog procesa (pristup autohidrolize), a ovakva hidroliza je primenjena na piljevini (Ojumu i Ogunkunle, 2005). Postupkom sa koncentrovanom kiselinom, koncentracije 30–70% H₂SO₄, postiže se veći prinos glukoze (90%) i ovaj proces je relativno brz (10–12 h), ali je količina korišćene kiseline otežavajući ekonomski faktor (Hamelinck i sar., 2005).

Hidroliza enzimima

Budućnost proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina danas u najvećoj meri zavisi od razvoja enzimskih postupaka, koji su još uvek prilično skupi da bi cena tako proizvedenog bioetanola bila konkurentna ceni fosilnog goriva ili ceni bioetanola proizvedenog iz skrobne biomase. Međutim, očekuje se značajan napredak u domenu poboljšanja celulolitičke aktivnosti (aktivnosti enzima celulaza), termičke stabilnosti enzima i efektivnosti konverzije celuloze do 2015. godine, što će ovaj proces, prema opštim predviđanjima, učiniti najkonkurentnijim za proizvodnju bioetanola. Metode koje će se koristiti za ove svrhe uključuju klasične metode i metode genetičkih modifikacija enzima. Cilj enzimske hidrolize je da se depolimerizuju polisaharidi – čvrsta frakcija koja ostaje posle predtretmana koja je nerastvorna u vodi. Posle većine predtretmana, glavni deo ovih polisaharida čini celuloza. Za sintezu celulolitičkih enzima najčešće se koriste plesni *Trichoderma reesei* i ređe *Aspergillus niger*. Plesni sintetišu kompleks celulolitičkih enzima potrebnih za efikasnu hidrolizu, od kojih su najvažnije tri grupe enzima koji deluju sinergistički: endo-β-1,4-glukanaze (EG, EC 3.2.1.4) napadaju endogeni deo lanca celuloze, celobiohidrolaze (CBH, EC 3.2.1.91) napadaju krajeve polimera, oslobađajući celobiozu koja se potom cepa na dva molekula glukoze pomoću enzima β-glukozidaze (BG, EC 3.2.1.21) (Lynd i sar., 2002). Takozvani „pomoćni“ enzimi kao što su hemicelulaze (Berlin i sar., 2005) i ligninaze (Palonen i Viikari, 2004) takođe mogu imati ulogu u hidrolizi tako što olakšavaju glavnim enzimima pristup celulozi. Aktivnost celobiohidrolaza rezultira u postepenom smanjenju nivoa polimerizacije dok endoglukanaze izazivaju cepanje celuloze u manje lance brzo smanjujući stepen polimerizacije. Endoglukanaze posebno dobro deluju na amorfnu celulozu, dok celobiohidrolaze deluju i na kristalnu celulozu (Lynd i sar., 2002). Iako *T. reesei* proizvodi nekoliko β-glukozidaza, koje razlažu hidrolizom nastale molekule celobioze na dva molekula glukoze, njihova aktivnost nije velika. Nažalost, celobiohidrolaze se inhibiraju celobiozom. Iz tog razloga je neophodno dodati i β-glukozidaze poreklom iz drugih mikroorganizama kako bi se pospešila efikasnost celulaza iz ove plesni.

Da bi došlo do hidrolize nerastvorne celuloze, potrebno je da se celulaze adsorbuju na površinu čestica supstrata. Trodimenzionalna struktura ovih čestica u kombinaciji sa njihovom veličinom i oblikom određuje da li će β -glikozidne veze biti pristupačne enzimu (Zhang i Lynd, 2004). Zbog toga je enzimska hidroliza celuloze sporija u poređenju sa enzimskom razgradnjom drugih biopolimera. Na primer, hidroliza skroba enzimom amilazom je 100 puta brža od brzine hidrolize celuloze celulazom pod industrijskim proizvodnim uslovima.

Efikasno uklanjanje lignina zahteva ekstremne uslove, pa se danas delignifikacija uspešno postiže sa belo-crvenim plesnima, koje pripadaju porodici *Basidiomycetaceae*. Ove plesni sintetišu oksidativne enzime, koji stvaraju radikale, sposobne da raskidaju kovalentne veze u ligninu. Ovi enzimi deluju sinergistički sa celulazama i hemicelulazama, uklanjajući ligninski sloj.

Visoki troškovi proizvodnje enzima kao i velike doze potrebne za hidrolizu prethodno pripremljene biomase, su osnovni nedostaci ovog procesa koji usporavaju njegovu komercijalizaciju u proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih sirovina.

Jedno od mogućih rešenja mogli bi biti celulozomi – strukture izolovane iz nekih mikroorganizama koje poseduju enzimске komplekse potrebne za razgradnju lignoceluloznih sirovina. Mikroorganizmi koji proizvode celulozome imaju sposobnost da simultano razgrađuju lignocelulozne sirovine prevodeći ih u sopstvenu ćelijsku masu i produkte metabolizma, kao što je etanol (Bayer i sar., 2007).

Fermentacija hidrolizata biomase

Fermentaciju hidrolizata do bioetanola vrši se primenom mikroorganizama kao što su kvasci. Pošto lignocelulozni hidrolizat ne sadrži samo glukozu već i razne monosaharide (ksiloza, manosa, galaktoza i arabinoza) i oligosaharide, mikroorganizmi bi trebalo da efikasno fermentišu ove šećere radi uspešne industrijske proizvodnje bioetanola (Katahira i sar., 2006). Cilj hemijskog procesa fermentacije je da prevede glukozu do alkohola i ugljen-dioksida. Reakcije koje se odigravaju u samom kvascu tokom ovog procesa su veoma složene ali se krajnji proces može prikazati jednačinom:



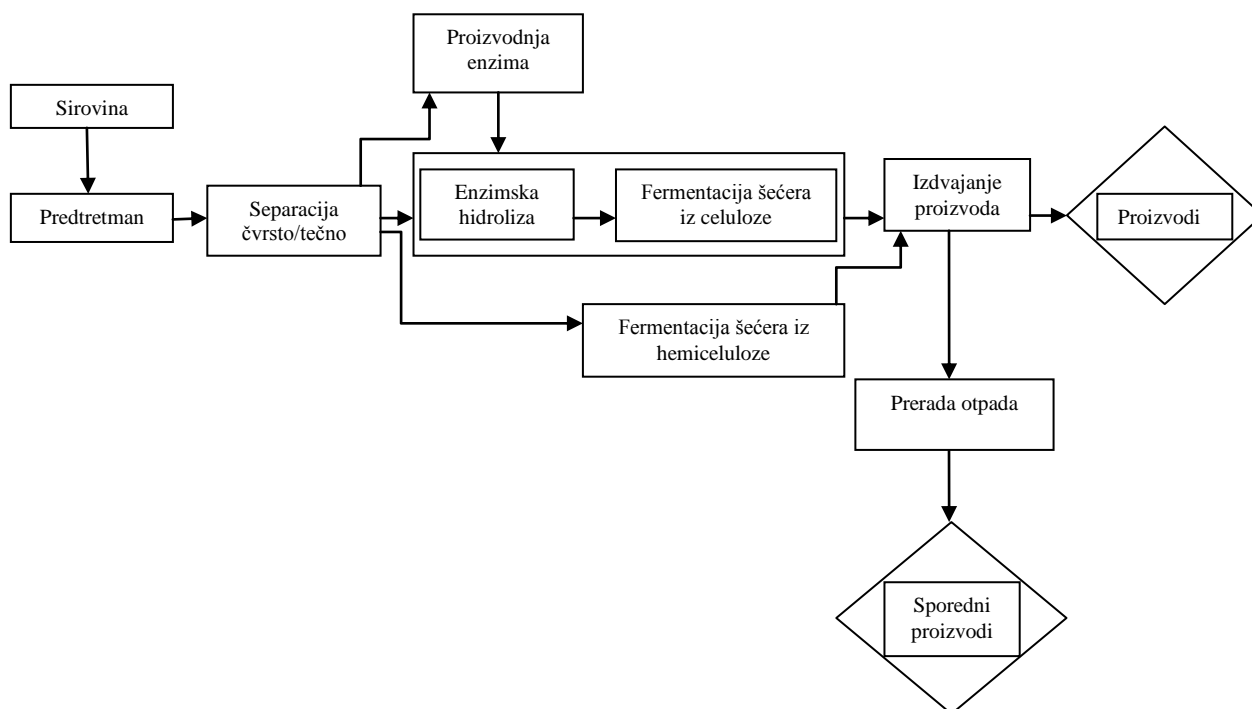
Teorijski se od 1 kg glukoze dobija 0,51 kg bioetanola i 0,49 kg ugljen-dioksida. Međutim, u praksi mikroorganizmi koriste deo glukoze za ćelijski rast tako da je realan prinos manji od 100% (tabela 4.6) (Demirbas, 2005).

Tabela 4.6. Prinosi bioetanola iz kukuruzovine primenom hidrolize sa koncentrovanom kiselinom (% suve mase)

Masa kukuruzovine, kg	1000
Masa celuloze, kg	430
Efikasnost konverzije i izdvajnja celuloze	0,76
Stehiometrijski prinos bioetanola	0,51
Efikasnost fermentacije glukoze	0,75
Prinos bioetanola iz glukoze, kg	130
Masa kukuruzovine, kg	1000
Masa hemiceluloze, kg	290
Efikasnost konverzije i izdvajnja hemiceluloze	0,90
Stehiometrijski prinos bioetanola	0,51
Efikasnost fermentacije ksiloze	0,50
Prinos bioetanola iz ksiloze, kg	66
Ukupni prinos bioetanola iz 1000 kg kukuruzovine	196 kg (225,7 l)

Odvojena hidroliza i fermentacija

Klasična konfiguracija procesa koja se koristi za fermentaciju hidrolizata biomase je proces iz dva koraka gde se hidroliza celuloze i fermentacija vrše odvojeno. Ova konfiguracija je poznata kao odvojena hidroliza i fermentacija (eng. *separate hydrolysis and fermentation* – SHF). Druga mogućnost je simultana saharifikacija i fermentacija (eng. *simultaneous saccharification and fermentation* – SSF) (slika 4.19) (Xu i sar., 2009; Claassen i sar., 1999; Cardona i Sanchez, 2007), gde se hidroliza i fermentacija odvijaju u istom reaktoru. Najčešće korišćeni mikroorganizam za fermentaciju lignoceluloznih hidrolizata je *Saccharomyces cerevisiae* koji fermentiše heksoze, ali ne i pentoze iz hidrolizata.



Slika 4.19. Šematski prikaz procesa simultane saharifikacije i fermentacije (SSF)

Kod odvojene hidrolize i fermentacije, čvrsta frakcija lignoceluloznog materijala se podvrgava hidrolizi (saharifikaciji). Ova frakcija sadrži celulozu u obliku koji je dostupan dejstvu kiselina ili enzima. Dobijeni hidrolizat celuloze se dalje fermentiše u drugom reaktoru i prevodi u etanol. Jedna od glavnih prednosti SHF procesa je što se svaki korak procesa može izvoditi pod optimalnim operativnim uslovima jer se odigravaju u dva odvojena reaktora. Najvažniji faktori koji se moraju uzeti u obzir kod saharifikacije su reakciono vreme, temperatura, pH, količina enzima i količina supstrata (Sanchez i Cardona, 2008).

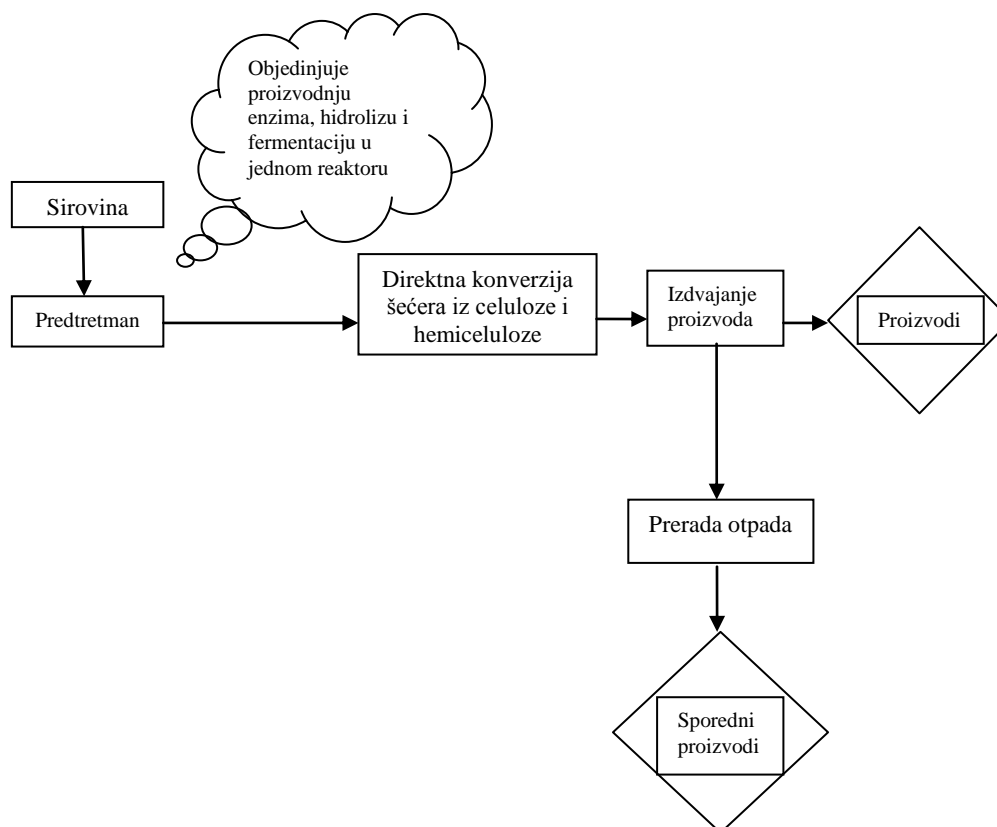
Simultana saharifikacija i fermentacija

Proces simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) pokazuje izvesne prednosti u odnosu na proces SHF, jer se postižu veći prinosi uz manji utrošak energije. U ovom procesu se celulaze i mikroorganizmi dodaju u isti reaktor, tako da ćelije kvasca odmah mogu da metabolišu glukozu koja nastaje tokom enzimske hidrolize celuloze, oslobađajući etanol. Na taj način se neutrališe inhibitorno dejstvo šećera na celulaze. Međutim, pošto je neophodno koristiti razblaženiji medijum kako bi se postigla odgovarajuća reološka svojstva, koncentracija finalnog proizvoda je niska. Pored toga, ovaj proces se odigrava pod uslovima koji nisu optimalni za hidrolizu i zahteva veće

doze enzima, što pozitivno utiče na konverziju supstrata, ali negativno na troškove procesa. Uzimajući u obzir da cena enzima čini veći deo troškova proizvodnje, neophodno je pronaći metode za smanjenje utroška enzima celulaze (Sanchez i Cardona, 2008).

Fermentacija pentoza

Jedan od osnovnih problema kod proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase je u tome što kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može da fermentiše samo određene mono- i disaharide kao što su glukoza, fruktoza, maltoza i saharoza. Ovaj mikroorganizam ne može da asimiluje celulozu i hemicelulozu direktno, niti pentoze koje nastaju hidrolizom celuloze (uglavnom ksiloza). Jedan od načina da se ovaj problem prevaziđe je primena genetičkog inženjeringa odnosno tehnologija rekombinantne DNK. Ovim metodama može se postići da proizvodni mikroorganizmi povećaju toleranciju na etanol i da prošire sposobnost da metabolišu različite supstrate. Tako na primer, modifikovani oblik *Z. mobilis* pored heksoza (glukoza, fruktoza), može da fermentiše i pentoze (ksiloza) u etanol (Mojović i sar., 2007). Drugi pristup je primena mikroorganizama koji fermentišu pentoze, kao što su neki kvasci i bakterije. U ovom slučaju, predlaže se konfiguracija sa odvojenom fermentacijom pentoza i heksoza. Kvasci kao što je *Pichia stipitis*, *Candida shahatae* i *Pachysolen tannophilus* mogu da asimiluju pentoze ali je njihov stepen konverzije glukoze do etanola pet puta manji nego što je slučaj sa *Saccharomyces cerevisiae*. Pored toga, zahtevaju kiseonik (aerisanje) a tolerantnost na etanol je 2–4 puta manja (Zhang i Lynd, 2004). Termofilne bakterije koje mogu da fermentišu pentoze su mikroorganizmi koji se mogu gajiti zajedno sa bakterijama koje hidrolizuju celulozu, kao što je *C. thermocellum* kako bi se vršila direktna konverzija predtretirane lignocelulozne biomase u etanol. Ovaj proces se naziva konsolidovani bioproces (eng. *consolidated bioprocessing* – CPB) (slika 4.20) (Xu i sar., 2009).



Slika 4.20. Šematski prikaz konsolidovanog bioprocesa CPB.

U mikroorganizme koji mogu da fermentišu heksoze i pentoze spada i gljiva *Mucor indicus* kojom se postiže prinos bioetanola od 0,46 g/g glukoze, kada se gaji pod anaerobnim uslovima. Pored toga, ova gljiva asimiluje inhibitore koji se javljaju u hidrolizatima razblaženih kiselina (Sues i sar., 2005).

Termohemijski postupci

Postoje dva postupka proizvodnje bioetanola koja uključuju i termohemijske reakcije. Prvi sistem je hibrid termohemijskog i biološkog sistema (Badger, 2002). Lignocelulozna biomasa se prvo termohemijski gasifikuje a sintetički gas (smeša vodonika i ugljen-monoksida) se uduvava u vidu mehurića kroz specijalno projektovane fermentore. Reakcija gasifikacije biomase je:



Mikroorganizam koji može da prevodi ovaj gas se uvodi u fermentor pod posebnim uslovima kako bi se započela fermentacija do bioetanola (Demirbas, 2005).

U drugom termohemijskom procesu proizvodnje bioetanola ne koriste se mikroorganizmi. U ovom postupku se lignocelulozna biomasa prvo gasifikuje, a sintetički gas zatim prolazi kroz sistem sa hemijskim katalizatorom, koji konvertuje sintetički gas do bioetanola. Dobijeni su prinosi do 50% etanola u procesu sa sintetičkim gasom. U postupcima u kojima prvo nastaje metanol, koji se zatim katalitičkim putem prevodi u etanol, postignuti su prinosi do 80% etanola. Nažalost, kao i kod drugih procesa, pronalaženje ekonomski isplativog termohemijskog postupka je i dalje u fazi istraživanja (Badger, 2002).

4.8. Inovacioni trendovi u procesima proizvodnje bioetanola

Primenom tehnologije mokrog mlevenja u proizvodnji bioetanola dobija se više sporednih proizvoda među kojima su brašno od kukuruznog glutena i hranivo od kukuruznih mekinja, međutim ova tehnologija zahteva veća kapitalna ulaganja i veće troškove za energije u poređenju sa tehnologijom suvog mlevenja u kojoj je najvažniji sporedni proizvod suva kukuruzna džibra sa rastvorenim materijama (Rodriguez i sar., 2010). Suva džibra se sastoji od hranljivih materija kukuruznog zrna koje ne mogu da fermentišu (masti, proteini, vitamini, minerali i vlakna) a njena tržišna vrednost iznosi oko 45% cene sirovog kukuruza (Singh i sar., 1997; Kwiatkowski i sar., 2006).

Ekspanzija proizvodnje bioetanola poslednjih godina uglavnom se zasnivala na procesu suvog mlevenja koji zahteva manja ulaganja kapitala i energije ali daje i manje sporednih proizvoda u poređenju sa procesom suvog mlevenja. U cilju dobijanja više sporednih proizvoda suvim mlevenjem razvijeno je nekoliko modifikovanih procesa. Neki istraživači su se bavili mogućnostima poboljšanja procesa „suvim razdvajanjem“ frakcija zrna (Clark, 2006; Murthy i sar., 2009; Nikolov i sar., 2012., Lohrman i sar., 2008). Postupci koji se zasnivaju na mokrom razdvajanju su „quick germ“ (brzo izdvajanje klice, engl), „quick germ-quick fiber“ ili „QQ“ (brzo izdvajanje klice i vlakana, engl), fracionisano suvo mlevenje i enzimsko mlevenje (E-milling) Singh i sar., 2005.a,b; Wang i sar., 2005.; Murthy i sar., 2006). „Quick germ“ – proces brzog uklanjanja klice predstavlja kombinaciju procesa proizvodnje etanola suvim i mokrim postupkom. Ovim postupkom se postiže povećanje vrednosti sporednih proizvoda suvog mlevenja jer se klica izdvaja pre početka fermentacije. Klica se separiše standardnim procesom koji je deo mokre prerade. Uštede koje se postižu izdvajanjem klice kao sporednog proizvoda i povećanjem kapaciteta fermentora zahvaljujući

uklanjanju nefermentabilnih supstanci iz fermentacione smeše kukuruza mogu umanjiti troškove proizvodnje etanola za 2,69 centi američkog dolara po litru u poređenju sa konvencionalnim postupkom suvog mlevenja (Singh i sar., 1997). „QQ“ proces predstavlja proširenje koncepta razdvajanja klice pre fermentacije i uključuje i izdvajanje kako klice tako i vlakana omotača zrna pre fermentacije (Wahjudi i sar., 2000). Zbog toga „QQ“ proces ima nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalno suvo mlevenje: smanjenjem sadržaja ukupnih vlakana i klice povećava se koncentracija proteina u modifikovanoj kukuruznoj džibri čime se poboljšava podobnost ovog sporednog proizvoda za ishranu nepreživara kao što su svinje i živina u odnosu na konvencionalnu džibru (Singh i sar., 1999); izdvojena klica je pogodnija za dobijanje drugih vrednih proizvoda kao što je ulje od koga se proizvodi i biodizel; iz izdvojene klice može se takođe dobiti ulje, fitosteroli koji imaju sposobnost snižavanja holesterola: ferulat fitosterol estri (FPE), slobodni fitosterol i fitosterol estri masnih kiselina (Singh i sar., 1999); takođe se nakon izdvajanja klice i omotača povećava brzina mlevenja zrna.

Početak „QQ“ procesa je sličan konvencionalnom mokrom mlevenju i sastoji se od močenja zrna (bez hemikalija) u trajanju od 3-12 h na temperaturi od 60°C nakon čega se u konvencionalnom mlinu uklanja klica. Nakon toga se klica i omotač mogu izdvojiti iz smeše pomoću hidrociklona zahvaljujući razlici u gustini. Smeša klice i perikarpa se zatim suši i razdvaja pomoću aspiratora a ostatak vlažnog zrna se melje i potom podvrgava standardnoj metodi dobijanja etanola procedurom sa suvim mlevenjem.

U tabeli 4.7. su dati materijalni bilansi glavnih i sporednih proizvoda tri vrste procesa proizvodnje bioetanola radi poređenja ekonomičnosti (Lin i sar., 2011). Rezultati ukazuju da je „QQ“ proces ekonomski najisplativiji.

Tabela 4.7. Poređenje prinosa i hemijskog sastava pojedinih proizvoda dobijenih postupcima suvog frakcionisanja, „QQ“ procesom i konvencionalnom suvom meljavom kukuruza, preračunato na suhu materiju

Proizvod	Prinos, kg kg ⁻¹ kukuruza	Hemijski sastav, %						
		Proteini	Ulje	Pepeo	NDF	Skrob	Šećer	Ostalo
<i>Proces suvog frakcionisanja</i>								
Suva džibra	0,19	39,52	4,57	1,30	27,66	6,18	16,66	4,10
Hranivo od klica	0,06	18,50	8,00	9,20	27,40	28,90	8,00	
Ulje	0,02		100,00					
Vlakna	0,04	8,90	5,00	2,80	44,40	36,90	2,00	
Etanol	0,31							
CO ₂	0,30							
<i>„QQ“ proces</i>								
Suva džibra	0,16	46,40	0,42	4,27	16,25	7,58	20,53	4,57
Hranivo od klica	0,04	25,10	7,00	4,20	47,10	12,50	3,80	0,30
Ulje	0,03		100,00					
Vlakna	0,06	8,57	9,10	1,28	69,70	10,00	0,85	0,50
Etanol	0,32							
CO ₂	0,31							
<i>Konvencionalni postupak suvog mlevenja kukuruza</i>								
Suva džibra	0,28	32,34	12,87	3,37	32,13	4,44	12,06	2,78
Etanol	0,33							
CO ₂	0,32							

Takozvano „enzimsko mlevenje“ ili E-milling je modifikovani proces mokre prerade kukuruznog zrna u kojem se koriste enzimi proteaze kako bi se izbacila upotreba sulfita i skratilo vreme močenja. Sumpor-dioksid koji se koristi u klasičnoj mokroj preradi kukuruza dospeva u atmosferu i može kod ljudi izazvati niz respiratornih oboljenja. Takođe, SO₂ oksidacijom u prisustvu drugih zagađujućih gasova u vazduhu gradi sumpornu kiselinu što dovodi do nastanka kiselih kiša. Koncentracija SO₂ neophodna za proces enzimskog mlevenja svedena je na minimum koji je neophodan da bi se sprečio rast mikroorganizama tokom močenja zrna, a vreme močenja se skraćuje šest puta, sa 36 na 6 sati. Procenjeno je da ovaj postupak može biti konkurentan konvencionalnom u uslovima visokih cena kukuruza kao sirovine s obzirom da se enzimskim procesom povećava prinos proizvoda mokrog mlevenja (Ramirez i sar., 2009).

Američka firma Poet patentirala je tehnologiju pod nazivom BPXTM (skraćeno od *Broin Project X*) koja je poznata i kao proces „hladne fermentacije“ zbog toga što se u procesu pripreme sirovine za fermentaciju koriste niske temperature (Lewis i sar., 2005, 2010). Ovim postupkom se znatno povećava efikasnost procesa proizvodnje

bioetanola. U osnovi, proces pripreme sirovina za fermentaciju je veoma sličan konvencionalnom enzimskom procesu osim što se koristi enzim koji može da hidrolizuje sirovi skrob, čime se eliminiše potreba za zagrevanjem smeše sirovine i vode. Osim što se eliminacijom faza zagrevanja troši 10-20% manje energije i dobijaju veći prinosi bioetanola (do 23% v/v), procesom hladne pripreme sirovina proizvodi se i hranljivija džibra jer se proteini čuvaju u nativnom obliku zato što ne dolazi do denaturacije toplotom.

Lignocelulozna biomasa predstavlja najperspektivniju sirovinu za proizvodnju bioetanola. Dostupnost i niske cene različitih vrsta ovih sirovina, pružaju velike mogućnosti za razvoj bioindustrije koja bi mogla da podrži razvoj međunarodnog tržišta biogoriva i doprinese smanjenju globalne emisije gasova staklene bašte.

Trenutne tendencije u istraživanjima radi poboljšanja proizvodnje bioetanola odnose se na prirodu biomase, faze procesa proizvodnje, integraciju pojedinih faza u odgovarajuću procesnu šemu (napr. SHF, SSF i CPB postupci), istraživanja na polju genetičkog inženjeringa i srodne inženjerske probleme.

4.9. Hrana za životinje

Pod stočnom odnosno hranom za životinje podrazumeva se sve ono što je uneto peroralnim putem i posle resorpcije iz digestivnog trakta može da obezbedi jednu ili više funkcija u životinjskom organizmu:

- da obezbedi energiju,
- da obezbedi materijal za izgradnju tkiva,
- da pomogne odvijanje biohemijskih i fizioloških funkcija,
- da ne utiče nepovoljno na iskorišćavanje hranljivih sastojaka,
- da ne škodi zdravlju (Bekrić, 1999).

U novije vreme ističu se još dva kriterijuma koja hrana treba da ispuni, a to su ekonomičnost i proizvodnja biološki visokovrednih i higijenski ispravnih namirnica animalnog porekla (Ševković i sar., 1996).

Uobičajeno je da se u ishrani stoke kao izvor hranljivih materija koristi više grupa stočnih hraniva:

- kabasta – suva hrana
- voluminozna – sočna hrana
- prekrupa žita
- proteinski koncentri
- ostala hraniva
- dodaci – aditivi (Bekrić, 1999).

Žita su primarni izvor energije u ishrani životinja i skoro uvek iziskuju veće troškove proizvodnje od kabastih hraniva, ali takođe sadrže mnogo više svarljivih ugljenih hidrata i masti. S obzirom na količinski udeo u smešama, iz žita dolazi najveći udeo proteina. U zavisnosti od smeše proteini iz prekrupe žita čini 25 do 65% ukupnog proteina u obroku. Kukuruz sadrži 8,5 do 9,5%, a ječam, ovas i pšenica od 10 do 12% ukupnog proteina.

Kukuruz je kod nas i u mnogim drugim zemljama u ishrani životinja potisnuo sva ostala žita zahvaljujući visokom sadržaju energije. Bogatstvo u skrobu, sadržaj srazmerno velike količine masti uz najmanji sadržaj celuloze doprinosi visokoj svarljivosti. Iako je deficitaran u dve esencijalne aminokiseline (lizinu i triptofanu), sa njegovim proteinom se zadovoljava od 20% ukupnih proteina u smešama za brojlere do 65% u smešama za završni tov svinja. Žuti tipovi zubana su bogati β -karotinom (3-5 mg

kg⁻¹) i ksantofilom (26-36 mg kg⁻¹). Žuti kukuruz, pored kukuruznog glutena i lucerke, najznačajniji je izvor pigmentacije jaja i boje kože (Bekrić, 1999).

Kao hranivo se najčešće koriste silaža i zrno kukuruza. Drobljenje i drugi vidovi fizičke i termičke obrade kao što su peletiranje, mikronizovanje, ekstrudiranje i slično, poboljšavaju svarljivost zrna kukuruza. Silaža se priprema tako što se cele zelene biljke posle berbe seckaju i smeštaju u silose gde biljna masa podleže prirodnoj mlečnokiselinskoj fermentaciji (mlečna kiselina konzervira hranljive sastojke) (Johnson, 1994).

U poslednje vreme suva kukuruzna džibra sa rastvorenim materijama sve više se koristi kao komponenta smeša za ishranu domaćih životinja.

Svaka vrsta i kategorija domaćih životinja zahteva precizno definisanu količinu svih hranljivih materija koja ih održava u zdravom stanju i optimalnoj produktivnoj sposobnosti. Pravilno određivanje nutritivnih potreba za uspešno gajenje i proizvodnost životinja zasnovano je na mnogobrojnim metaboličkim i hranidbenim ogledima koji su u toj meri složeni da se u praksi one definišu koncenzusom postignutim u udruženjima nutricionista, tehnologa, odgajivača, istraživačkih organizacija ili nacionalnih komiteta, kao što je slučaj sa NRC preporukama u SAD. Osim preporuka, u mnogim zemljama se nutritivni zahtevi za pojedine vrste i kategorije domaćih životinja normiraju u formi obavezujućih standarda i pravilnika. Pravilnikom se propisuje minimalan sadržaj: vlage, proteina, masti, aminokiselina, lizina i metionina, kalcijuma, fosfora (ukupnog i iskoristivog), natrijuma, 6-8 mikroelemenata, 6-10 vitamina i sadržaj energije izveden računski i izražen u MJ (Bekrić, 1999).

Troškovi proizvodnje određene smeše za ishranu životinja u koje treba uračunati cenu sirovina pojedinih komponenata, takođe su jedan od značajnih faktora koje treba imati u vidu.

Osnovni hemijski sastojci koncentrovanih hraniva za životinje su: proteini, ugljeni hidrati, masti, minerali, vitamini i voda.

Proteini služe za porast, odnosno izgradnju tela kada su životinje mlade, tj. za porast i razvoj jer se telo tada konstantno izgrađuje novim ćelijama. Svaka nova ćelija za svoju izgradnju zahteva proteine određenog kvaliteta odnosno aminokiselinskog sastava. Bremenite životinje, kao i one u laktaciji imaju posebne zahteve za proteinima.

Ugljeni hidrati i masti su izvor energije u hrani koja je potrebna za funkcionisanje celog organizma i održavanje toplote tela. Takođe su neophodni za proizvodnju mleka i održavanje telesne mase i porasta stasalih – zrelih životinja.

Za uspešnu ishranu životinja potrebno je da u hrani budu u dovoljnim količinama prisutni **minerali**: kalcijum, fosfor, natrijum, magnezijum, jod, kobalt, gvožđe, bakar, molibden, mangan, cink, sumpor, selen i fluor. Mineralne materije u organizmu životinja služe kao gradivni materijal, ulaze u sastav kostiju, zuba, ćelija i tkiva. Održavaju potreban osmotski pritisak i površinski napon u tečnostima organizma čime pomažu apsorpciju, ekskreciju i sekreciju. Regulišu koncentraciju vodonikovih jona u krvi i ćelijama. Učestvuju u reakcijama, nadražaju i pokretljivosti mišića i nerava.

Vitamini obezbeđuju regulaciju između unosa hrane, životnog okruženja i fizioloških procesa u organizmu. Po ulozi u ćelijskom metabolizmu mogu se podeliti u dve grupe: 1) vitamini koji deluju biokatalitički tj. učestvuju u formiranju enzima i javljaju se kao njihov sastavni deo i 2) vitamini sa induktivnim dejstvom koji obezbeđuju regulaciju metaboličkih procesa. Na proces usvajanja vitamina takođe utiču komponente hraniva.

Najveći deo organizma životinja sastoji se od **vode**. Fiziološki voda služi za prenošenje hranljivih sastojaka kroz organizam, odvijanje fermentacionih procesa, lučenje sokova, učestvuje u varenju i svarljivosti, omogućava hemijske reakcije, izlučivanje štetnih materija iz organizma i održavanju temperature tela.

II EKSPERIMENTALNI DEO

5. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

5.1. Materijal

1. Kukuruzno brašno 27 hibrida kreiranih u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ U eksperimentima je korišćeno zrno i kukuruzno brašno celog zrna dobijeno od 27 hibrida kukuruza Instituta za kukuruz „Zemun Polje“. Među njima su hibridi standardnog hemijskog sastava zrna decenijama zastupljeni u poljoprivredi i industriji prehrambenih proizvoda, novi visokoprosinosni hibridi standardnog hemijskog sastava zrna, i hibridi specifičnih svojstava zrna. Ispitivani hibridi su različite genetičke osnove i različite dužine vegetacije. Hibridi korišćeni u eksperimentima prikazani su u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Hibridi kukuruza korišćeni u eksperimentima

ZP 172/8	ZP 548	ZP 677
ZP 243	ZP 560	ZP 74 b
ZP 341	ZP 574/8	ZP 747
ZP 362	ZP 600	ZP 749
ZP 377	ZP 606	ZP 789
ZP 434	ZP 611 k	ZP 808
ZP 444	ZP 620 b	ZP 877
ZP 484	ZP 633	ZP Rumenka
ZP 505	ZP 666	ZP 704 wx

Odabrani hibridi kukuruza gajeni su 2009. godine u istim agrotehničkim uslovima na oglednim parcelama Instituta za kukuruz u Zemun Polju. Setva kukuruza izvršena je po metodi potpuno slučajnog rasporeda parcela u dva ponavljanja. Uzorci klipova hibrida za ispitivanje uzimani su sa elementarnih površine 7m² (2 reda) sa gustom useva 55.000 biljaka po hektaru. Za analizu je uzimano od svakog hibrida po 20 slučajno izabranih klipova koji su prosušeni u mrežastim vrećama prirodnim strujanjem vazduha. Na klipovima su izmereni fizički parametri, dužina, debljina, broj zrna i masa oklaska, nakon čega su ručno okrunjeni i zrno odloženo u posebne kontejnere iz kojih su uzimani uzorci za sve analize.

2. Kvasac iz kolekcije laboratorije za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*

3. Za pravljenje mikrobioloških podloga korišćeni su:

- sladni bujon, (Torlak, Beograd);
- agar, (Torlak, Beograd);

4. Enzimski preparati:

- Termamyl SC, (Novozymes, Danska), aktivnost A=133 KNU/g;
- SAN Extra L, (Novozymes, Danska), aktivnost A=437 AGU/g;
- Pepsin Art 7190 (Merck), aktivnost A= 2000 FIP U/g;
- Celulaza R10 iz *Trichoderma viridae*, (Onozuka);

5. Ostale korišćene hemikalije p.a. čistoće su:

- koncentrovana fosforna kiselina H_3PO_4 , (Centrohem, Beograd);
- vodonik-peroksid H_2O_2 , 30%, (Centrohem, Beograd);
- katalizator (Se + K_2SO_4), (Centrohem, Beograd);
- natrijum-hidroksid NaOH, (Lac - Ners, s.r.o., Neratovice, Češka);
- hlorovodonična kiselina $c= 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, (Lac - Ners, s.r.o., Neratovice, Češka);
- borna kiselina H_3BO_3 , (Centrohem, Beograd);
- indikator metil-crveno, (Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija);
- 96% etanol, (Centrohem, Beograd);
- sredstva protiv penušanja (dekalin-dekahidronaftalin);
- aceton, (Lac - Ners, s.r.o., Neratovice, Češka);
- dietil-etar, čist, (Lac - Ners, s.r.o., Neratovice, Češka);
- cetavlon (cetil trimetilamonijum-bromid), (Centrohem, Beograd);
- dekalin, (Centrohem, Beograd);
- kalcijum-hlorid-dihidrat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, (Centrohem, Beograd)
- sumporna kiselina, H_2SO_4 , 96%, p.a.(Lac - Ners, s.r.o., Neratovice, Češka);
- magnezijum-sulfat-heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija);
- amonijun-sulfat, $(NH_4)_2SO_4$ (Centrohem, Beograd);
- kalijum-dihidrogen-fosfat, KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb);
- cink-sulfat-heptahidrat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Centrohem, Beograd);

- 3,5-dinitrosalicilna kiselina, $C_7H_4N_2O_7$, 98%, (Acros Organics, New Jersey, SAD);
- α - D (+)-glukoza, bezvodna (dekstroza, kukuruzni šećer), $C_6H_{12}O_6$ (Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD);
- natrijum-sulfit, Na_2SO_3 , (Zorka, Šabac);
- kalijum-natrijum-tartarat, $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$, (Centrohem, Beograd);
- natrijum-hlorid, $NaCl$, (Centrohem, Beograd);
- kalijum-metabisulfit, $K_2S_2O_5$, (Centrohem, Beograd);

Korišćeni uređaji i instrumenti su:

- vodeno kupatilo sa mešanjem: model GFL 1083, (GFL- Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Nemačka);
- vodeno kupatilo (statično): Sutjeska, model za 240 epruveta, (Fabrika medicinskih uređaja, Beograd);
- digitalna analitička vaga: model A200S, (Sartorius Analytic, Nemačka);
- analitička vaga: model 2452, (Sartorius Analytic, Nemačka);
- tehnička vaga: Mettler PN2210, (Mettler, Nemačka);
- varijabilne mikropipete: 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, (Brand GmbH, Nemačka);
- pH metar: Beckman Φ^{TM} 20, (Beckman Instruments, SAD);
- termostat za uzgajanje mikroorganizama na 30°C, (Sutjeska, Beograd);
- autoklav, (Sutjeska, Beograd);
- brojač kolonija: Colony Star 8500, (Funke Gerber Nemačka);
- elektromagnetna mešalica: ARE Heating Magnetic Stirrer, (Velp Scientifica srl, Italija);
- vorteks, (Velp Scientifica srl, Italija);
- električni rešo, (Končar, Zagreb);
- UV/vidljivi spektrofotometar: Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System, (Agilent Technologies, Nemačka);
- centrifuga, (Tehtnica, Železniki);
- polarimetar: Polamat A, (Carl Zeiss, Jena, Nemačka);
- laboratorijska sušnica: Sutjeska (60-200°C), (Fabrika medicinskih uređaja, Beograd);
- ventilaciona sušnica, (Sutjeska, Beograd);

- peristaltička pumpa: VRE 88, (Verder, Nemačka);
- protočni termostat: Tip 3230, (VEB MLW Prüfgeräte-Werk, Nemačka);
- električna peć za žarenje: Jumo Lan (50-1200°C), (Naber Industrieofenbau, Nemačka);
- aparat za određivanje sadržaja azota (proteina): Kjeldhal Analyzer, (Foss Tecator, Švedska);
- aparat za određivanje sadržaja vlakana: Fibertec 2010 Heat Extractor, (Foss Tecator, Švedska).

5.2. METODE

5.2.1. Određivanje fizičkih karakteristika kukuruznog zrna

Za određivanje fizičkih karakteristika zrna korišćene su sledeće metode:

Za merenje **parametara tvrdoće**, kao što su: otpornost na mlevenje, zapremina mliva i udeo tvrde i meke frakcije endosperma adaptiran je Stenvert-Pomerancov (Stenvert-Pomerantz) test (Pomerantz i sar., 1985) Ručnom disekcijom kukuruznog zrna utvrđen je udeo njegovih **morfoloških frakcija i tip endosperma**.

Hektolitarska ili zapreminska masa predstavlja masu u jedinici zapremine, odnosno gustinu zrnene mase. Određuje se na Šoperovoj (Shopper) vagi u pet uzastopnih merenja, a rezultat izražava u $\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$ kao prosečna vrednost preračunata na 13% vlage.

Masa 1000 zrna ili apsolutna masa određena je brojanjem i merenjem pet puta po 200 celih zrna a prosečna vrednost je preračunata na suhu materiju.

Gustina ili specifična masa se određuje u specijalnoj koloni na osnovu razlike nivoa 96% etanola pre i posle potapanja 100 zrna poznate mase (Cronje i sar., 1991). Rezultat se izračunava na osnovu mase i zapremine potapanih zrna.

Indeks flotacije ili procenat plivajućih zrna u rastvoru natrijum nitrata je svojstvo koje ukazuje na stepen tvrdoće kukuruza. Određuje se merenjem plivajućih zrna, nakon potapanja 100 zrna definisane vlažnosti u rastvoru natrijum nitrata definisane specifične gustine ($1,250 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) (Gestencorn, 1991).

Indeks apsorpcije vode se određuje merenjem količine vode koju pod tačno definisanim uslovima apsorbuje određena količina kukuruznog zrna (Hsu i sar., 1983).

5.2.2. Određivanje hemijskog sastava kukuruznog zrna

5.2.2.1. Metoda za određivanje sadržaja suve materije

Postupak:

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

Zatim se u vegeglas dodaje oko 2 g uzorka i izmeri masa. Vegeglas se suši sa uzorkom preko noći (najmanje 16h) u sušnici na 105°C sa koso postavljenim poklopcem. Nakon sušenja, vegeglas se zatvori poklopcem i hladi u eksikatoru oko 1h. Merenje se vrši odmah nakon vađenja vegeglasa iz eksikatora. Izvrši se ponovno sušenje, 30-60 minuta dok se ne postigne konstantna masa (Rajković i sar., 1983).

Izračunavanje:

$$M_S(\%) = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \cdot 100 \quad (1)$$

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

5.2.2.2. Polarimetrijska metoda za određivanje sadržaja skroba

Skrob pokazuje veliku optičku aktivnost ($[\alpha]_D^{20} = 190^\circ - 202^\circ$), te je zbog toga pogodan za polarimetrijsko određivanje. Da bi se sadržaj skroba mogao odrediti polarimetrijski, potrebno ga je prethodno prevesti u rastvorno stanje što se postiže dodatkom hlorovodonične kiseline. Na rezultat polarimetrijskog određivanja skroba utiču i druge optički aktivne supstance, te se zbog toga treba tačno pridržavati procedure. Šećeri i druge optički aktivne materije odstranjuju se ekstrakcijom, odnosno kvalitativnim ispiranjem uzoraka hladnom vodom.

Ostale optički aktivne supstance talože se primenom različitih sredstava za bistrenje, kao što su natrijumfosfovolframat, bazni olovoacetat, infuzorijska zemlja i drugi.

Tačnost i reproduktivnost polarimetrijskog određivanja skroba zavisi od koncentracije hlorovodonične kiseline u kojoj se rastvara skrob, kao i vremena i temperature zagrevanja, odnosno hlađenja u toku izvođenja samog eksperimenta.

Polarimetrijsko određivanje skroba pogodno je za analizu čistog skroba, kao i namirnica sa velikim sadržajem skroba (brašno, hleb, pecivo, dijetetska hrana, sušeni krompir itd). U praksi najčešće korišćena polarimetrijska metoda za određivanje skroba je metoda po Eversu (Ewers) ili njena modifikacija sa korekcijom za rastvorljive ugljene hidrate (Ewers, 1908).

Metoda po Eversu sa korekcijom za rastvorljive ugljene hidrate

Na analitičkoj vagi se odmeri oko 5 g fino usitnjenog materijala za analizu i kvantitativno prenese u normalni sud po Kolraušu (Kohlrausch) od 100 cm³. U normalni sud sa prethodno odmerenim uzorkom doda ukupno 50 cm³ 1,124% rastvora hlorovodonične kiseline, prvo se doda 25 cm³ rastvora i normalni sud dobro promućka. Preostalom količinom rastvora se speru zidovi normalnog suda. Potom se sud postavi u ključalo vodeno kupatilo i zagreva tačno 15 minuta, uz neprestano mešanje sadržaja suda tokom prva 3 minuta. Po isteku vremena zagrevanja, normalni sud se izvadi iz ključalog vodenog kupatila, dopuni hladnom destilovanom vodom do 90cm³ i sadržaj u njemu brzo ohladi u struji hladne vode do 20°C. U normalni sud se zatim doda 5cm³ rastvora 4% fosforvolframove kiseline (sredstva za bistrenje) i promućka. Normalni sud se dopuni do crte destilovanom vodom i rastvor se filtrira kroz suvi kvalitativni filter papir. Bistrim rastvorom se napuni polarimetrijska cev i izmeri ugao skretanja polarizovane svetlosti pomoću polarimetra. Merenje se vrši na talasnoj dužini živine lampe $\lambda_{\text{Hg}}=546,1\text{nm}$ i na temperaturi od 20°C. Pri ovim uslovima specifični ugao rotacije $[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$ za pojedine vrste skrobova dat je u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Specifični ugao rotacije pojedinih vrsta skroba

Poreklo skroba	Specifičan ugao rotacije, $[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$
Kukuruz	216,98
Pšenica	214,75
Krompir	228,62
Raž	216,28
Ječam	213,34
Ovas	213,10

Sadržaj skroba ($S_{\text{Skroba,uk}}$) u gramima na 100 g vlažnog materijala izračunava se po sledećoj formuli:

$$S_{\text{Skroba,uk}} = \frac{\alpha \cdot 100 \cdot 100}{L \cdot [\alpha]_{\text{Hg}}^{20} \cdot m_{\text{s,uk}}} \quad (2)$$

gde je:

- α – ugao skretanja polarizovane svetlosti za uzorak;
- $[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$ - specifični ugao rotacije;
- $m_{\text{s,uk}}$ – odmerena količina uzorka, (g);

- L – dužina polarimetarske cevi, (cm);

Određivanje rastvorljivih ugljenih hidrata, odnosno korekcija izvodi se na sledeći način. Najpre se na analitičkoj vagi odmeri oko 10 g homogenog i fino usitnjenog uzorka kome se određuje sadržaj skroba. Odmereni uzorak se kvantitativno prenese u normalni sud od 100 cm³ po Kohlrausch-u i prelije sa oko 75 cm³ destilovane vode. Normalni sud se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi tačno 40 minuta uz često mešanje. Potom se u normalni sud doda 5 cm³ olovoacetata, ponovo promućka i dopuni do crte zasićenim rastvorom natrijumsulfata. Sadržaj normalnog suda se filtrira kroz suv kvalitativni filter papir i od filtrata odvoji 50 cm³ i prenese u čist normalni sud od 100 cm³. U normalni sud sa filtratom dodaje se 3 cm³ 25% rastvora hlorovodonične kiseline i nakon toga sud se stavlja u ključalo vodeno kupatilo gde se drži tačno 15 minuta. Nakon zagrevanja, sud se hladi u struji hladne vode do 20°C i u ohlađeni rastvor doda 1-2 cm³ 4% rastvora fosforvolframove kiseline. Sadržaj suda se promućka i dopuni destilovanom vodom do crete. Rastvor se filtrira kroz suv kvalitativni filter papir i filtrat sipa u polarimetrijsku cev. Merenje se vrši kao i u prethodnom slučaju, na talasnoj dužini živine lampe i temperaturi od 20°C.

Sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata ($S_{R.u.h.}$) u gramima na 100 grama vlažnog materijala izračunava se po sledećoj formuli:

$$S_{R.u.h.} = \frac{\alpha_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 2}{L \cdot [\alpha]_{D_20}^{20} \cdot m_{R.u.h.}} \quad (3)$$

gde je:

- $m_{R.u.h.}$ – odmerena količina uzorka za rastvorne ugljene hidrate, odnosno za slepu probu, (g).

Sadržaj skroba sa korekcijom za rastvorljive ugljene hidrate se izražava u gramima na 100 grama suve materije uzorka i izračunava prema formuli:

$$S_{Skroba}(\%) = \frac{(S_{Skroba} - S_{R.u.h.}) \cdot 100}{M_S} \quad (4)$$

gde je:

- M_S – procenat suve materije ili (100 - W), gde je W procenat vlage u uzorku

Određivanje skroba se vrši u dva ponavljanja, a rezultat izražava preračunat na suhu materiju.

5.2.2.3. Određivanje sadržaja proteina metodom po Kjeldalu

Princip i primena:

Princip metode po Kjeldalu (Kjeldahl) se zasniva na zagrevanju i razaranju organske supstance sa sumpornom kiselinom, u prisustvu katalizatora. Izdvojeni azot se prevodi u amonijak i vezuje sa kiselinom kao amonijum-sulfat. Dodatkom natrijum-hidroksida ponovo se oslobađa azot i destiliše u sud u kome se nalazi određena količina kiseline poznate koncentracije. Završnom titracijom utvrđuje se količina preostale kiseline. Od dobijene količine azota, uz pomoć korektivnog faktora, izračunava se ukupna količina sirovih proteina. Metoda se primenjuje pri određivanju sirovih proteina u žitu i mlinskim proizvodima.

Pribor:

- 1) aparat za destilaciju, po Kjeldalu;
- 2) mlin za fino usitnjavanje uzoraka;
- 3) stakleni tubusi za razaranje, po Kjeldalu, zapremine 500 ml;
- 4) analitička vaga, opsega merenja od 100 g do 160 g, osetljivosti 0,0001 g;
- 5) konusna erlenmajer-tikvica zapremine 300 ml;
- 6) grejno telo za razaranje, sa 20 mesta (u digestoru);
- 7) levkovi, prečnika 3 cm;
- 8) uređaj za titraciju, sa elektromagnetom, zapremine 20 ml sa podelom od 0,02 ml.

Reagensi:

Kao reagensi se koriste:

- 1) koncentrovana sumporna kiselina H_2SO_4 , bez primesa azota (tehnička);
- 2) koncentrovana fosforna kiselina H_3PO_4 ,
- 3) vodonik-peroksid H_2O_2 , 30%
- 4) katalizator (Se + K_2SO_4) dobro raspršen i homogenizovan u tarioniku;
- 3) 40% rastvor natrijum-hidroksida NaOH,
- 4) rastvor hlorovodonične kiseline, $c_{(HCl)} = 0,1 \text{ N mol l}^{-1}$;
- 5) 40% borna kiselina H_3BO_3 ;
- 6) kombinovani indikator: 0,1 g metil-crvenog usitni se u tarioniku sa približno 20 ml 96% etanola.

Rastvor se dekantuje u čašu zapremine 200 ml. Cela operacija se ponavlja dok se sav indikator metil-crvenog ne rastvori i prenese u čašu. Na čašu se postavi levak i

preko njega unese 0,15 g brom-krezol-zelenog. Levak se zatim ispere i čaša do crte dopuni etanolom. Prelazak iz crvenog u zeleno je pri pH vrednosti 5,1. Indikator je pogodan za rad i pod električnim osvetljenjem, a ne samo pri dnevnoj svetlosti. U 10 l borne kiseline dodaje se 100 ml rastvora brom-krezol-zelenog i 70 ml rastvora metil-crvenog.

7) jonizujuća voda za destilacioni aparat treba da sadrži 3,5 g natrijum-sulfata Na_2SO_4 na 5 l destilovane vode i 1,2 kg NaOH na 3 l destilovane vode.

Postupak:

Ako je uzorak u zrnju, usitnjava se najpre u mlinu za fino usitnjavanje, a zatim se odmeri približno 0,1-0,2 g i kvantitativno prenese u tikvicu za razaranje, zapremine 500 ml. Zatim se doda 7 do 10 g pripremljenog katalizatora i pažljivo se usipa 5 ml smeše koncentrovane sumporne i fosforne kiseline (50:1) i 2,5 ml vodonik peroksida. Na tikvice za razaranje postave se mali levkovi (da bi se sprečilo eventualno prskanje kapi smeše izvan tikvice). Masa u tikvici se pažljivo promućka i postavi na rešo za razaranje. Razaranje se vrši 45 minuta na temperaturi od 420°C, a zatim se boca ohladi. U tubuse se zatim doda oko 75 ml destilovane vode. U erlenmajere se doda po 25 ml borne kiseline sa indikatorima (rastvor ciklama boje). Boca za razaranje priključi se na destilacioni uređaj. Ventil se zatvori i uključi se destilacioni aparat. Po završetku destilacije, predestilisana tečnost u erlenmajerima daje zeleno obojenje. Titracija se vrši rastvorom 0,1 mol l⁻¹ HCL.

Izračunavanje:

Sadržaj proteina (S_{proteina}) izračunava se prema formuli:

$$S_{\text{Proteina}}(\%) = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{slepa proba}}) \cdot N \cdot 1,4007}{m_{\text{uzorka}}} \cdot F \cdot 100 \% \quad (5)$$

- V_{HCl} , $V_{\text{slepa proba}}$, (ml);
- N – koncentracija HCl, (mol l⁻¹);
- m_{uzorka} , (g);
- F – 6,25 faktor za izračunavanje sadržaja proteina za kukuruz.

Ponovljivost:

Razlika između dva paralelna određivanja koja je istovremeno ili jedno za drugim izveo isti analitičar može iznositi 0,2 jedinice apsolutne vrednosti.

5.2.2.4. Određivanje sadržaja ulja metodom po Soksletu

Metoda određivanja masti i ulja u biljkama po Soksletu (Soxhlet) zasniva se na rastvaranju masnih materija u pojedinim isparljivim organskim rastvaračima, posle čega se upotrebljeni rastvarači mogu lako odstraniti, a sirova ulja koja posle toga ostanu suše se, hlade, mere i izračunavaju iz dobijenih podataka prostim računom ili pomoću obrasca.

Sokslet aparatura:

Stakleni baloni sa ravnim dnom 500 ml, ekstrakcioni deo i kondenzator. Sva tri dela spojena su u jedan aparat, a više ovih aparata instaliraju se u vodeno kupatilo. Potrebne su i analitičke vage, eksikator, hilzne, vata i posuda za odmeravanje uzorka.

Priprema uzorka:

Uzorak se najpre samelje na laboratorijskom mlinu sita prečnika otvora 0,7 mm. Tako samleven uzorak se prethodno dobro izmeša, stavlja u vegeglase i suši u sušnici 12h na temperaturi 105°C. Osušeni uzorak se potom hladi u eksikatoru 40 minuta. Ohlađeni uzorak se odmerava i sipa u hilzne koje su prethodno sušene i 2h na 105°C. Hilzne sa materijalom se zatvaraju vatom i stavljaju u eksikator. Obično se odmerava 4 g materijala. Odmeravanje se vrši u dve probe. Posle merenja materijala, mere se baloni koji su prethodno sušeni 2h na 105°C. Hilzna sa uzorkom se stavlja u ekstrakcioni deo koji je spojen sa kolbom i hladnjakom. S gornje strane hladnjaka pomoću levka uliva se toliko etra da se ekstrakcioni deo napuni i prelije malo u kolonu.

Ekstrakcija:

Etar pri zagrevanju isparava i njegove pare prolaze kroz ekstrakcioni deo i odlaze u hladnjak gde se kondenzuju i u obliku kapljica padaju u ekstrakcioni deo gde se rastvaraju ulja. Kada se ekstrakcioni deo napuni etrom, on se prazni sifoniranjem i sa masnim materijama vraća ponovo u balon. Ekstrakcija traje 7-8h. Posle završene ekstrakcije, hilzna se izvadi iz ekstrakcionog dela, etar predestiliše u ekstrakcioni deo i pre sifoniranja odlije. Baloni sa uljem se stavljaju u sušnicu gde se suše 2h na temperaturi 105°C. Tako osušeni se stave u eksikator 40 minuta i potom mere.

5.2.2.5. Određivanje sadržaja sirove celuloze

Da bi se odredio sadržaj celuloze u jednom uzorku potrebno je iz njega putem hidrolize odstraniti proteine, skrob, masne materije i druge svarljive ugljene hidrate. Metoda se zasniva na tretiranju uzorka sumpornom kiselinom i kalijum-hidroksidom, pa se ostatak odvoji filtriranjem i, posle sušenja i žarenja, izmeri. Korišćena metoda za određivanje sadržaja sirove celuloze je Vendeova (Weende) metoda (AFNOR, 1993; Pravilnik o metodama, 1987). Metoda je prilagođena za rad na aparatu Fibertec System (1010 Heat Extractor i 1020 Cold Extractor) proizvođača Tecator, Švedska.

Reagensi:

- Sumporna kiselina;
- kalijum-hidroksid;
- antipenušajući agens (dekalin-dekahidronaftalin);
- aceton.

Rastvori:

- 1,25% sumporne kiseline (H_2SO_4);
- 1,25% kalijum-hidroksid (KOH).

Postupak za pripremu rastvora:

1,25% rastvor sumporne kiseline se priprema na sledeći način:

- 6,82 ml koncentrovane sumporne kiseline se postepeno kap po kap doda u 1 litar destilovane vode uz hlađenje.

1,25% rastvor kalijum-hidroksida se priprema na sledeći način:

- Na tehničkoj vagi se odmeri 12,5 g kalijum- hidroksida i rastvori u normalnom sudu od 1 litar u destilovanoj vodi.

Metoda:

- 1) Na analitičkoj vagi odmeriti 1-1,5 g uzoraka u filter lončice (m_1).
- 2) Filter lončici se postave u stalak koji je pričvršćen za aparat, prihvate se specijalnom viljuškom koja kao i stalak ima šest mesta, nivelišu a zatim pažljivo prenose i postavljaju na aparat.
- 3) Pritiskom na dole na ručnu polugu na aparatu, filter lončici se instaliraju na kolone za hidrolizu.
- 4) Okretanjem poluge u levo za reagens R1 dodati 150 ml prethodno zagrejanje H_2SO_4 , dodati 2-4 kapi dekalina, a zapim pritiskom na dugme za grejač na aparatu zagrejati

smešu u kolonama do ključanja. Na komandnoj tabli aparata pritiskom na dugme reagens rastvori se zagrevaju pomoću grejača koji su postavljeni u plastične boce na aparatu.

- 5) Na časovniku aparata podesiti vreme ključanja na 30 minuta i kuvati uz ključanje 30 minuta.
- 6) Nakon isteka 30 minuta isključiti grejač.
- 7) Okretanjem poluge na gore „vakuum” na aparatu odfiltrirati rastvor pa zatim isprati toplom vodom, koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu na aparatu a zagrejana je pritiskom dugmeta „water“, uz neprestano vakuum filtriranje.
- 8) Nakon ispiranja u kolone se dodaje 150 ml 1,25% prethodno zagrejanog rasvora kalijum-hidroksida okretanjem poluge za reagens u desno (R2) na aparatu, dodati 2-4 kapi dekalina i kuvati 30 minuta da ključa kao u slučaju dodavanja rastvora 1 (Ponoviti postupke pod tačkama 5, 6 i 7).
- 9) Prihvatiti filter lončice sa specijalnom viljuškom, osloboditi filter lončice sa kolona, vratiti na stalak za filter lončice, iznivelisati i pažljivo preneti na deo aparata za hladnu filtraciju. Ručnom polugom koja se nalazi na delu aparata za hladnu filtraciju povlačenjem na dole fiksirati filter lončice.
- 10) Isprati tri puta acetonom.
- 11) Viljuškom prihvatiti filter lončice i oslobađanjem poluge, preneti ih u stalak i nivelisati. Skinuti viljušku sa filter lončica i rukom preneti u petri šolju.
- 12) Filter lončice u petri šolji u sušnicu koja je prethodno zagrejana na temperaturu od 105°C i sušiti do konstantne mase (12 časova).
- 13) Osušene uzorke hladiti u eksikatoru 60 minuta i meriti na analitičkoj vagi (m_2).
- 14) Filter lončice sa uzorkom preneti u peć za žarenje na ulazni deo peći da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti (da pepeo pobeli) najmanje tri časa na 500°C.
- 15) Posle žarenja filter lončice mašicama pomeriti ka ulaznom delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom ih preneti u eksikator.
- 16) Filter lončice hladiti u eksikatoru oko 60 minuta i potom meriti na analitičkoj vagi (m_3).

Izračunavanje:

Sadržaj celuloze izražava se u procentima mase i izračunava po sledećoj formuli:

$$S_{\text{Celuloze}}(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (6)$$

gde je:

- m_1 - masa filter lončića sa uzorkom, (g);
- m_2 - masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja, (g);
- m_3 - masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja, (g).

Sadržaj celuloze računat na suhu materiju dobija se iz formule:

$$S_{\text{Celuloze,S.M.}}(\%) = \frac{S_{\text{Celuloze}}}{M_S} \cdot 100 \quad (7)$$

Kao rezultat uzima se srednja aritmetička vrednost najmanje dva uporedna određivanja. Razlika između rezultata dve paralelne probe ne sme biti veća od 1%.

5.2.2.6. Određivanje sadržaja pepela

Princip i primena:

Princip se zasniva na spaljivanju uzorka na temperaturi od 580°C i merenju dobijenog ostatka.

Aparati i pribor:

Koriste se sledeći pribor:

- 1) mlin za usitnjavanje zrna, koji se lako čisti i koji brzo melje, bez osetnog zagrevanja mlina;
- 2) posuda za spaljivanje (tigel) ravnog dna od porculana;
- 3) ploča s električnim zagrevanjem ili Bunzenov plamenik;
- 4) peć s regulatorom temperature i dovoljnim strujanjem vazduha;
- 5) eksikator sa tubusom i perforiranom pločom od porculana ili aluminijuma, koji je snabdeven efikasnim sredstvom za sušenje (npr. kalcijum-hlorid, fosfor-pentoksid ili silikagel);
- 6) analitička vaga, s tačnošću od 0,0001 g;
- 7) termorezistentna ploča.

Postupak:

Očišćene posude za sagorevanje žare su u peći pri temperaturi od 580°C u trajanju od 2h, hlade u eksikatoru najmanje 1h do sobne temperature i izmere sa tačnošću 0,001 g. Od pripremljenog (samlevenog) uzorka, koji je prethodno osušen i određena mu je vlaga, odmeri se 2 - 3 g (ako se očekuje da će vrednost pepela biti iznad 1%) i rastresito rasprostre u sloju jednake debljine u izarene posude za spaljivanje. Ako se očekuje da će sadržaj pepela u suvoj materiji biti manji od 1% odmerava se 5 – 6 g uzorka.

Da bi se postiglo ujednačeno sagorevanje proizvoda, sadržaj posude treba neposredno pre sagorevanja prelitati sa 1 do 2 ml vodonik-peroksida. Posuda sa odmerenim uzorkom najpre se zagreva na električnoj grejnoj ploči ili na Bunzenovom plameniku. Treba nastojati da se pri sagorevanju ne pojavi plamen i sagorevanje nastaviti do potpunog ugljenisanja. Čim se sadržaj u posudi ugljeniše, posuda se pažljivo unosi u peć, prethodno zagrejanu do temperature od 580°C. U peći mora biti obezbeđeno strujanje vazduha i kad su vrata zatvorena ali ne toliko jako da odnosi delove supstance iz posude. Uzorci se žare 10-12h. Sagorevanje se smatra završenim kad je ohlađeni ostatak bele boje.

Kad se sagorevanje završi, posuda se izvadi iz peći i hladi 1 minut na termorezistentnoj ploči, a zatim se stavi u eksikator da se ohladi do sobne temperature. Zbog higroskopnosti pepela, uzorak se brzo izmeri, sa tačnošću 0,001 g. Postupak zagrevanja, hlađenja i merenja ponavlja se sve dok se dobije konstantna masa, odnosno da razlika dva uzastopna merenja između dodatnog spaljivanja (za vreme od 1h) ne bude veća od 0,0002 g. Na istom uzorku izvode se najmanje dva određivanja.

Izračunavanje:

Sadržaj pepela S_{Pepela} izražava se u procentima mase u odnosu na suhu materiju i izračunava po sledećoj formuli:

$$S_{\text{Pepela}}(\%) = \frac{m_1 \cdot 100}{m_0} \cdot \frac{100}{100 - V} \quad (8)$$

gde je:

- m_0 - masa uzorka za ispitivanje, (g);
- m_1 - masa ostatka, (g);
- V - količina vode u ispitivanom uzorku, (%).

Kao rezultat uzima se aritmetička sredina dva određivanja ako su zadovoljeni uslovi ponovljivosti. Rezultat se izražava sa dve decimale.

Ponovljivost:

Pri paralelnim određivanjima na istom uzorku odstupanje u količini pepela ne sme biti veće od: 0,02 (apsolutne vrednosti) ako je količina pepela manja od 1% (w/w); 2% srednje vrednosti ako je količina pepela veća od 1% (w/w). Ako su navedene granice prekoračene, ispitivanje se mora ponoviti sa dva paralelna određivanja.

5.2.2.7. Određivanje svarljivosti suve materije *in vitro* enzimskom metodom (pepsin-celulazna metoda)

Svarljivost suve materije određivano je metodom koju su predložili Aufréré i Demarquilly (1989).

Reagensi:

- 1) Hlorovodonična kiselina (0,1 N HCl);
- 2) Pepsin (Merck 2000FIP U/g 1077190);
- 3) Natrijum-acetat $\times 3\text{H}_2\text{O}$;
- 4) celulaza „Onozuka R 10" (1.02321.0025*MC Merck).

Za rad su potrebni:

- Stakleni filter lončići: prečnik 30 mm, visina 146 mm, od sinterovanog stakla porozitet filtera 2, proizvođač „UNIGLAS“ Subotica.
- Silikonski zapušači: prečnik 30/38 mm, visina 35 mm.

Rastvori:

- 1) 0,1% rastvor pepsina (Ravnomerno rastvoriti 2g pepsina u 0,1 N HCl i dopuniti do 1000 ml)
- 2) Acetatni pufer (Rastvoriti 6,8 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ u destilovanoj vodi, podeseti pH na 4,8 pomoću koncentrovane sirćetne kiseline ukapavanjem Pasterovom pipetom i dopuniti do 1000 ml)
- 3) Rastvor celulaze (Rastvoriti 1g celulaze u 1000 ml rastvora natrijum acetata pripremljenog prema gore opisanom postupku).

Postupak:

- 1) Samleti uzorak u mlinu sa sitom promera otvora 0,8-1mm i odrediti sadržaj suve materije (sušenjem na 103°C).
- 2) Čiste filter lončice žariti 3h na 500°C.
- 3) Izvaditi filter lončice u eksikator da se ohlade.
- 4) Meriti jedan po jedan prazan filter lončić na analitičkoj vagi sa 4 decimale i u svaki odmeriti po 0,5g uzorka u tri ponavljanja.
- 5) Filter lončice sa donje strane zatvoriti silikonskim zapušačima.
- 6) U svaki filter lončić sipati po 50 ml rastvora pepsina koji je prethodno zagrejan u vodenom kupatilu na 40°C ± 1°C.
- 7) Zatvoriti filter lončice sa gornje strane silikonskim zapušačima.
- 8) Staviti filter lončice u termostat (vodeno kupatilo) zagrejan na 40°C ± 1°C i inkubirati 24h.
- 9) Filter lončice sa sadržajem blago promućkati posle 1, 6 i 22h od trenutka stavljanja na inkubiranje.
- 10) Po isteku 24h izvaditi filter lončice iz termostata (vodenog kupatila).
- 11) Staviti filter lončice 30min u sušnicu koja je zagrejana na 80°C ± 1°C (radi hidrolize skroba).
- 12) Izvaditi filter lončice iz sušnice i skinuti im gornje zapušače.
- 13) Jednom po jednom filter lončiću skidati donji silikonski zapušač, stavljati ga na vakum bocu i filtrirati sadržaj.
- 14) Talog u svakom filter lončiću isprati tri puta sa po 80ml (ili više) destilovane vode zagrejane na 80°C.
- Napomena: Voda ispod filtra mora biti bistra.
- 15) Zatvoriti filter lončice sa donje strane silikonskim zapušačima.
- 16) U svaki filter lončić sipati po 50ml sveže pripremljenog rastvora celulaze zagrejanog u vodenom kupatilu na 40°C ± 1°C.
- 17) Zatvoriti filter lončice sa gornje strane silikonskim zapušačima.
- 18) Staviti filter lončice u termostat (vodeno kupatilo) koji je zagrejan na 40°C ± 1°C i inkubirati 24h.
- 19) Filter lončice sa sadržajem blago promućkati posle 1, 6 i 22h od trenutka stavljanja na inkubiranje.
- 20) Po isteku 24h izvaditi filter lončice iz termostata (vodenog kupatila).
- 21) Skinuti gornje silikonske zapušače sa filter lončića.

22) Jednom po jednom filter lončiću skidati donji silikonski zapašać, stavljati ga na vakuum bocu i filtrirati sadržaj.

23) Talog u svakom filter lončiću isprati tri puta sa po 80ml (i više) destilovane vode zagrejane na 80°C.

Napomena: Voda ispod filtra mora biti bistra.

24) Preneti filter lončice sa talogom u sušnicu zagrejanu na na 103°C ± 1°C i sušiti 48h.

25) Izvaditi filter lončice sa talogom u eksikator da se ohlade.

26) Izmeriti filter lončice sa talogom na analitičkoj vagi sa četiri decimale.

Izračunavanje:

- m_0 – masa prazne posude, (g);
- m_2 – masa prazne posude + talog (suva materija), (g);
- m_3 – masa prazne posude + pepeo (pepeo), (g);
- E_{SM} – sadržaj suve materije u uzorku, (g);
- E_{OM} – sadržaj organske materije u uzorku (suva materija – pepeo), (g);
- S_{SM} – svarljivost suve materije određena pomoću celulaze, (%);
- S_{OM} – svarljivost organske materije određena pomoću celulaze, (%);

$$S_{SM}(\%) = \frac{E_{SM} - (m_1 - m_0)}{E_{SM}} \cdot 100 \quad (9)$$

$$S_{OM}(\%) = \frac{E_{OM} - (m_1 - m_2)}{E_{OM}} \cdot 100 \quad (10)$$

Dozvoljeno je odstupanje između dve paralelene probe je ±1%. U slučaju većeg odstupanja, analizu treba ponoviti.

5.2.3. Izvođenje dvojno-enzimske hidrolize

Hidroliziti kuruznog brašna su dobijani dvojno-enzimskom hidrolizom skrobne suspenzije sa komercijalnim enzimskim preparatima: Termamyl SC, aktivnosti 133 KNU/g (KNU odnosno Kilo Novo Jedinica α -amilaze je količina enzima koja razgrađuje 5,26 g skroba u toku jednog sata) i SAN Extra L deklarisanе aktivnosti od 437 AGU/g (AGU je količina enzima koja hidrolizuje 1 μ mol maltoze u minutu pod specifikovanim uslovima).

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

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

U cilju ispitivanja kinetike enzimске hidrolize, uzorci za određivanje koncentracije glukoze analizirani su na svakih sat vremena.

Pri optimizaciji faze likvefakcije i saharifikacije pored promene koncentracije glukoze, praćena je i promena prinosa glukoze, dekstroznog ekvivalenta i procenta od teorijske koncentracije glukoze tokom enzimске hidrolize. Dekstrozni ekvivalent je merilo stepena hidrolize skroba, odnosno indikator stepena hidrolize skroba do šećera i predstavlja procenat hidrolize glikozidnih veza u odnosu na početni broj glikozidnih veza, odnosno sadržaj redukujućih šećera izražen kao glukoza (dekstroza) na suhu materiju (g glukoze/100 g suve materije). Tako glukoza ima dekstrozni ekvivalent 100, maltoza 50, a skrob približno 0. Jednačine za izračunavanje prinosa glukoze, dekstroznog ekvivalenta (Baras i sar., 1992) i procenta od teorijske koncentracije glukoze (Thomas i sar., 1996) su sledeće:

$$c_s = \frac{m_{s,poč}}{V_{suspenzije}} \quad (11)$$

$$Y'_{P/S} = \frac{c_{glu}}{c_s} \quad (12)$$

- c_s – početna koncentracija skroba u suspenziji, ($g\ l^{-1}$);
- $m_{s,poč}$ – početna masa skroba u brašnu određenog hibrida, (g);
- $V_{suspenzije}$ – zapremina suspenzije, (l);
- $Y'_{P/S}$ – prinos glukoze, ($g\ g^{-1}$);
- c_{glu} – eksperimentalna koncentracija glukoze, ($g\ l^{-1}$);

$$DE = \frac{c_{glu}}{SM} \cdot 100 \quad (13)$$

- DE – dekstrozni ekvivalent, (%);
- c_{glu} – eksperimentalna koncentracija glukoze, (%);
- SM – sadržaj suve materije kukuruznog brašna, (%);

$$\% \text{ od } c_{glu,teor} = \frac{c_{glu,exp}}{c_{glu,teor}} \cdot 100 \quad (14)$$

- % od $c_{glu,teor}$ – procenat od teorijske koncentracije glukoze, (%);
- $c_{glu,exp}$ – eksperimentalna koncentracija glukoze, ($g\ l^{-1}$);
- $c_{glu,teor}$ – teorijska koncentracija glukoze, ($g\ l^{-1}$);

$$c_{glu,teor} = c_s \cdot 1,111 \quad (15)$$

- c_s – početna koncentracija skroba u suspenziji, ($g\ l^{-1}$);
- Faktor 1,111 je izveden na osnovu činjenice da je potreban 1 molekul vode za hidrolizu svake glikozidne veze u skrobu. Na osnovu stehiometrijske jednačine hidrolize skroba do glukoze, ovaj faktor je jednak odnosu $180n/(162n + 18)$, gde je n broj ostataka glukoze u polimeru skroba.

5.2.4. Priprema laboratorijske kulture kvasca

Kultura kvasca je čuvana na kosom sladnom agaru na $+4^{\circ}C$, a za potrebe eksperimenata aktivirana je u sladnom bujonu korišćenjem tehnike pasažiranja (3 puta). Zasejavanje 50 ml sladnog bujona vršeno je 24h pre početka alkoholne fermentacije korišćenjem 1% inokuluma. Inkubacija se odvijala u termostatu na temperaturi od $30^{\circ}C$ i trajala 24h. Nakon inkubacije podloga je zamućena bez promene boje, nema površinskog rasta, a formiran talog je sitnozrn i beo. Ovako dobijena sveža kultura je

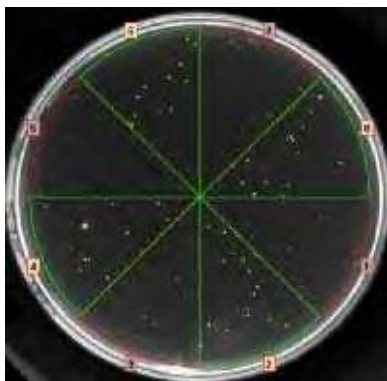
korišćena za inokulaciju hidrolizata kukuruznog brašna. Jedan litar podloge sladni agar sadrži 20 g sladnog bujona (17 g sladnog ekstrakta i 3 g peptona) i 18 g agara koji se dodaje za očvršćavanje mikrobioloških podloga. Podloga je sterilisana u autoklavu na temperaturi od 120°C i pritisku od 1,5 bar u periodu od 30 minuta.

5.2.5. Određivanje ukupnog broja ćelija kvasca Kohovom metodom agarne ploče

Kvantitativno određivanje broja ćelija kvasca vršeno je indirektnom metodom za brojanje ćelija po Kohu. Ova metoda se sastoji iz tri osnovne etape:

- 1) priprema razređenja;
- 2) zasejavanje i inkubiranje;
- 3) brojanje izraslih kolonija i izračunavanje ukupnog broja živih ćelija u 1 ml ispitivanog uzorka.

Iz dobro izmešanog hidrolizata uzme se uzorak od 1 ml koji se zatim rastvori u 9 ml fiziološkog rastvora, čime se dobija razblaženje od 10^{-1} . Razblaživanja se vrše u epruvetama sa sterilnim fiziološkim rastvorom. Potom se vrši serija razblaženja, tako da je svako sledeće razblaženje deset puta veće od prethodnog. Po 1 ml iz epruveta sa razblaženjima 10^{-4} , 10^{-6} i 10^{-8} prenosi se pipetom u Petri šolje prelivene hranljivom podlogom sladni agar. Inkubacija Petri šolja vrši se u termostatu na 30°C u trajanju od 48h. U Petri šoljama sa 30-300 kolonija broje se sve kolonije. Brojanje se vrši golim okom ili lupom. Prilikom brojanja Petrijeva kutija se postavlja tako da je poklopac sa donje strane a dno sa gornje, pa se spolja po staklu svaka izbrojana kolonija obeleži flomasterom za staklo. Radi lakšeg brojanja, dno Petrijeve kutije se podeli na jednake sektore, izbroje se kolonije u nekoliko sektora, nađe srednja vrednost i pomnoži ukupnim brojem sektora (slika 5.1).



Slika 5.1. Petri šolja sa kolonijama kvasca

Ukupan broj živih ćelija u 1 ml hidrolizata dobija se množenjem ukupnog broja kolonija izbrojanih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem. U slučaju da postoje prisutne ćelije kod sva tri razblaženja, traži se srednja vrednost broja ćelija.

$$N = m \cdot n \quad (16)$$

gde je,

- N – broj ćelija;
- m – broj kolonija (srednja vrednost više merenja);
- n – razređenje.

Ako Petri šolje sadrže preko 300 kolonija, najbolje je brojanje vršiti pomoću aparata za brojanje kolonija sa montiranom lupom i staklenom površinom koja se odozdo osvetljava i na kojoj su ucrtani kvadrati površine 1 cm². Brojanje kolonija se vrši na raznim mestima ploče sa različitom gustinom kolonija. Izračunava se srednja vrednost za jedan kvadratni centimetar te se pomnoži sa površinom ploče i razređenjem čime se dobija ukupan broj živih ćelija u 1 ml ispitivanog supstrata.



Slika 5.2. Aparat za brojanje kolonija

5.2.6. Izvođenje alkoholne fermentacije

Alkoholna fermentacija hidrolizata kukuruznog brašna je izvođena u anaerobnim uslovima, u šaržnom postupku sa izabranim kulturama kvasaca na temperaturi od 30°C, u vodenom kupatilu bez mešanja. Pre početka fermentacije hidrolizat je obogaćen faktorima rasta: 0,4 g l⁻¹ MgSO₄, 2,0 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ i 4,0 g l⁻¹ KH₂PO₄. U toku fermentacije vršeno je korigovanje pH vrednosti na 5.

U eksperimentima su korišćene slobodne ćelije kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* pri koncentraciji inokuluma 2% (v/v). Tok fermentacije je praćen određivanjem promene sadržaja etanola i koncentracije glukoze. Kinetika fermentacije je praćena u toku različitih vremenskih intervala: 24, 36, 48 i 72h radi određivanja optimalne dužine trajanja alkoholne fermentacije, pri različitim uslovima odvijanja eksperimenata. Tokom fermentacije praćena je i promena parametara kao što su: prinos etanola, procenat od teorijskog sadržaja etanola, volumetrijska produktivnost i potrošnja glukoze. Ovi procesni parametri računaju se prema sledećim jednačinama (Çaylak i sar., 1998):

$$Y_{P/S} = \frac{c_{glu}}{c_s} \quad (17)$$

- $Y_{P/S}$ – prinos etanola, (g g⁻¹)
- c_{et} – eksperimentalni sadržaj etanola, (%);
- c_s – početna koncentracija skroba u suspenziji, (g l⁻¹);

$$\% \text{ od } c_{et,teor} = \frac{c_{et}}{c_{et,teor}} \cdot 100 \quad (18)$$

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

$$c_{et,teor} = c_{glu,teor} \cdot 0,51 \quad (19)$$

$$P = \frac{c_{et}}{\tau} \quad (20)$$

- P – volumetrijska produktivnost, (g l⁻¹ h⁻¹);
- c_{et} – eksperimentalni sadržaj etanola, (g l⁻¹);
- τ – vreme fermentacije, (h);

$$\text{POTROŠNJA GLUKOZE(\%)} = \frac{c_{glu,kr.} - c_{glu,poč.}}{c_{glu,poč.}} \cdot 100 \quad (21)$$

- $c_{glu,poč.}$ – početna koncentracija glukoze u hidrolizatu, (g l⁻¹);

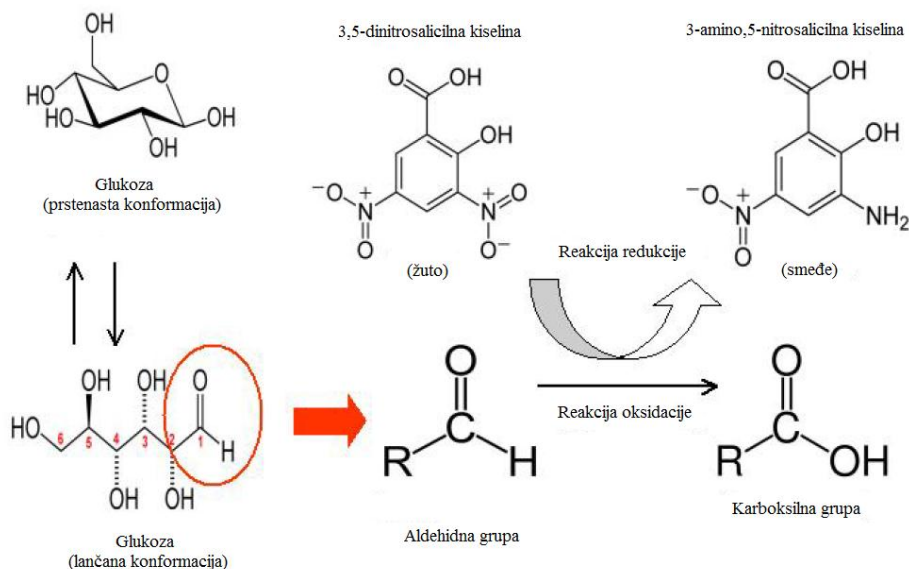
- $c_{\text{glu,kr}}$ – krajnja koncentracija glukoze, (g l^{-1}).

5.2.7. Izvođenje postupka simultane saharifikacije i fermentacije (SSF)

U eksperimentima u kojima se izvodi postupak simultane saharifikacije i fermentacije (SSF proces), nakon završene faze utečnjavanja skroba suspenzija se ohladi i koriguje se pH vrednost na 5,0 pomoću 1 M rastvora sumporne kiseline. Istovremeno se dodaju: enzim SAN Extra L (u optimalnoj koncentraciji koja je određena u prethodnim eksperimentima enzimske hidrolize) i slobodne ćelije kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (pri koncentraciji inokuluma od 2% v/v). Simultana saharifikacija i fermentacija izvođena je u balonima u vodenom kupatilu. U jednom setu eksperimenata u vodenom kupatilu je primenjivano mešanje brzinom 100 rpm, a drugi set eksperimenata je vršen bez mehaničkog mešanja. Kinetika SSF procesa je ispitivana u toku 48h, na temperaturama 30°C.

5.2.8. Određivanje sadržaja redukujućih šećera u hidrolizatu

Sadržaj redukujućih šećera, odnosno sadržaj glukoze je određivan spektrofotometrijskom metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS). Ovom metodom se određuje prisustvo slobodne karbonilne grupe (C=O) kod redukujućih šećera. To podrazumeva oksidaciju aldehidne funkcionalne grupe (kod glukoze), odnosno keto funkcionalne grupe (kod fruktoze) do karboksilne grupe. Oksidacija se odvija u prisustvu 3-amino,5-nitrosalicilne kiseline u alkalnoj sredini sa karakterističnim crveno-smeđim obojenjem. Reakcija je prikazana na slici 5.3.



Slika 5.3. Mehanizam reakcije glukoze sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom

U tečnom rastvoru glukoza postoji u dva konformaciona oblika – prstenastom i lančanom koji su u ravnoteži. U prisustvu 3,5-DNS, aldehidna grupa glukoze se oksiduje do karboksilne grupe, dok se 3,5-dinitrosalicilna kiselina redukuje do 3-amino,5-nitrosalicilne kiseline.

Reagensi:

- 1% rastvor 3,5-dinitrosalicilne kiseline:
 - 10 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline
 - 0,5 g natrijum-sulfita, Na_2SO_3
 - 10 g natrijum-hidroksida, NaOH
 - dodati destilovanu vodu do 1 l.
- 40% rastvor kalijum-natrijum-tartarata.

Postupak izvođenja eksperimenta:

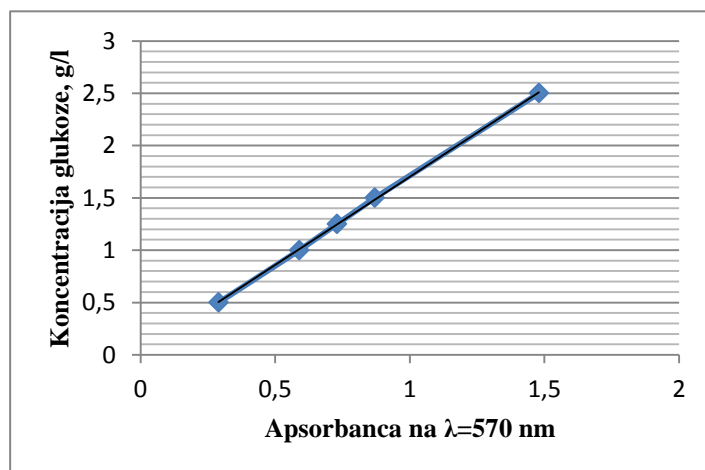
1 ml uzorka (filtrata hidrolizata) se pipetom prenese u normalni sud od 100 ili 250 ml u zavisnosti od očekivane koncentracije glukoze, koji se zatim postepeno dopuni destilovanom vodom do crte. Nakon toga se sadržaj promeša. Iz normalnog suda se uzme 3 ml razblaženog rastvora šećera i prenese u epruvetu, a zatim doda 3 ml rastvora dinitrosalicilne kiseline. Kontrolni uzorak za kalibrisanje spektrofotometra se pravi tako što se umesto 3 ml razblaženog rastvora šećera doda 3 ml destilovane vode, dalji postupak je identičan.

Epruvete se zatvore i kuvaju u ključaloj vodi 5-15 minuta do postizanja crveno-smeđeg obojenja. Kontrolni uzorak zadržava žutu boju. Potom se u topao rastvor dodaje 1 ml rastvora kalijum-natrijum-tartarata kako bi se stabilizovala boja. Sadržaj u epruvetama se hladi do sobne temperature i meri apsorbancu na spektrofotometru podešenom na talasnu dužinu 570 nm. Koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao glukoza, određuje se iz standardne krive dobijene merenjem apsorbance rastvora glukoze poznatih koncentracija na talasnoj dužini 570 nm.

U tabeli 5.3. su prikazane vrednosti apsorbance za standardne koncentracije rastvora glukoze a na slici 5.4. je prikazana standardna kalibraciona kriva zavisnosti koncentracije glukoze od apsorbance izmerene na talasnoj dužini od 570 nm.

Tabela 5.3. Zavisnost apsorbance na $\lambda=570$ nm od koncentracije standardnog rastvora glukoze

Koncentracija glukoze, g l ⁻¹	Apsorbancu na 570 nm
0,50	0,29
1,00	0,59
1,25	0,73
1,50	0,87
2,50	1,48



Slika 5.4. Kriva zavisnosti koncentracije rastvora glukoze od apsorbance na $\lambda=570$ nm

Jednačina krive prikazane na slici je $y = 1,683 \cdot x + 0,016$ pa se koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao glukoza, izračunava prema sledećoj jednačini:

$$c_{\text{glu}} = (1,683 \cdot A + 0,016) \cdot R, r^2 = 0,999 \quad (22)$$

gde je:

- c_{glu} – koncentracija glukoze, (g l^{-1});
- A – apsorbanca na talasnoj dužini 570 nm;
- R – razblaženje rastvora šećera (100 ili 250)
- r^2 - koeficijent determinacije ili kvadrat koeficijenta korelacije.

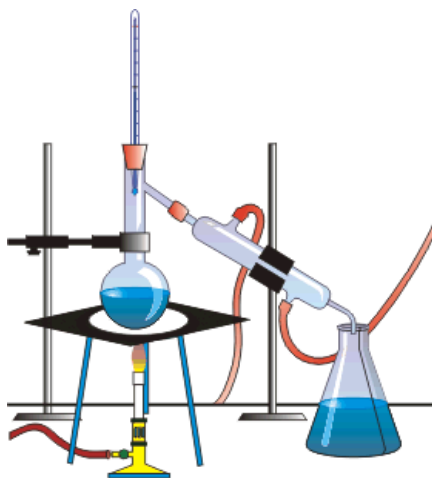
5.2.9. Određivanje sadržaja bioetanola

Metoda se zasniva na zavisnosti gustine destilata etanola od sadržaja etanola (Rajković i sar., 1983). Pošto je etanol specifično lakši od vode, sa porastom njegovog sadržaja u vodi opada gustina destilata. Rauscher i Voidt su dali tabelu zavisnosti gustine od sadržaja etanola u vodi na temperaturi od 20°C (tabela je data u prilogu). Pored etanola destilišu i druge isparljive materije koje nastaju u toku fermentacije. U većini slučajeva sadržaj isparljivih komponenata je veoma nizak pa se njihov uticaj na gustinu može zanemariti. Za destilaciju se koristi aparatura prikazana na slici 5.5.

Postupak:

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

U prethodno izmereni balon zapremine 300-500 cm^3 odmeri se n grama (oko 40 g) fermentisane suspenzije. Zatim se sud spoji pomoću gumenog zatvarača sa Libigovim hladnjakom. Destilat se prihvata u praznom piknometru, koji može da bude uronjen u posudu sa ledom.



Slika 5.5. Aparatura za destilaciju

Balon se mora zagrevati tako da se destilacija završi u toku 30-45 minuta. Nakon završene destilacije, piknometar se dopuni destilovanom vodom i suv odmeri na analitičkoj vagi.

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

$$\rho^{20} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \quad (23)$$

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

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

$$c_{et} = \frac{(a \cdot c)}{n} \quad (24)$$

- c_{et} – sadržaj etanola, (% w/w);
- a – masa destilata, odnosno izraz (C-A) iz jednačine 21;
- c – sadržaj etanola u destilatu u masenim % (iz tabele I);
- n – masa uzetog uzorka, (g).

5.2.10. Određivanje kvaliteta suve kukuruzne džibre

Uzorci džibre su pripremljeni tako što je nakon završenog procesa fermentacije dekantovana ukupna džibra i sušena u ventilacionoj sušnici na 60°C u trajanju od 48h. Potom su uzorci usitnjeni u avanu i samleveni u laboratorijskom mlinu sa rotirajućim metalnim sečivom i vodenim hlađenjem. U tako pripremljenim uzorcima je određen procenat vlage, odnosno sadržaj suve materije gorenavedenom metodom (odeljak 5.2.2.1).

Sadržaj vlakana: NDF, ADF, ADL, hemiceluloze i celuloze u uzorcima džibre određen je prema metodologiji koju je uspostavio Van Soest (Van Soest, 1963; Van Soest i Wine, 1967; Goering i Van Soest, 1970; Van Soest i sar., 1991; Mertens, 1992), uz odgovarajuće modifikacije. Metode su modifikovane za rad na aparatu "Fibertec

system-Heat Extractor: 1010,1021" proizvođača Tecator, Švedska. Analize se vrše u dve paralelne probe, a dozvoljena razlika između dve paralelne probe je 1%.

Savremena podela ugljenih hidrata biljnih hraniva izvršena je na ugljene hidrate koji potiču iz ćelijskih zidova (opni biljnih ćelija) i ugljene hidrate koji su sadržani unutar biljnih ćelija. Prema toj podeli ovi ugljeni hidrati se svrstavaju u tri osnovne grupe: NDF (*Neutral Detergent Fibres*), ADF (*Acid Detergent Fibres*) i NFC (*Nonfiber Carbohydrates*, nevlaknasti ugljeni hidrati, engl.). Prva grupa sastoji se od hemiceluloze, celuloze i lignina a druga od celuloze i lignina. Ove dve grupe ugljenih hidrata potiču iz ćelijskih zidova. NFC, odnosno treću grupu ugljenih hidrata biljnih hraniva čine: skrob, šećeri, pektin i β -glukani. Smešteni su unutar same biljne ćelije. Lignin se nalazi i u prvoj i u drugoj grupi, a u literaturi se označava kao ADL (*Acid Detergent Lignin*) (Pejić, 1994).

NDF (skraćeno od *Neutral Detergent Fibres*, vlakna nerastvorljiva u neutralnim deterdžentima, engl.) sastoji se od hemiceluloze, celuloze i lignina. Predstavljaju vlakna koja se dobijaju kuvanjem biljnih uzoraka u neutralnom deterdžentu čime se iz uzorka uklanjaju: skrob, šećeri, proteini, masti, pektin, β -glukani, kao i pepeo (mineralne materije) žarenjem uzorka na 500°C. Sa povećanjem sadržaja NDF-a u nekom hranivu smanjuje se količina hraniva koju životinja može da unese u organizam (konzumira).

Primena:

Ova metoda primenjuje se za određivanje NDF vlakana u kabastim i koncentrovanim hranivima i hrani za životinje. Da bi se odredio sadržaj NDF-a u jednom uzorku i znjega je potrebno putem hidrolize odstraniti: skrob, šećere, proteine, masti, pektin, β -glukane, kao i pepeo žarenjem na 500°C.

Reagensi:

- natrijumdodecil-sulfat
- dinatrijum-etilendiamintetraacetat (EDTA)
- natrijum-tetraborat
- dinatrijumhidrogen-fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)
- metil-celosol
- dekalin
- aceton
- natrijum-sulfat

Rastvor deterdženta za reagens 1 (R1) pH 6,9-7,1:

Rastvoriti u 1000 ml destilovane vode:

- 30,0 g natrijumdodecil-sulfata;
- 18,61 g dinatrijum-etilendiamintetraacetata;
- 6,81 g natrijum-tetraborata;
- 7,77 g dinatrijumhidrogen-fosfata i
- 10,0 ml metil-celosola.

Sve reagente rastvoriti u manjoj količini destilovane vode u normalnom sudu od 1000 ml uz povremeno zagrevanje na rešou. Nakon toga normalni sud dopuniti do 1000 ml. Proveriti pH vrednost rastvora. Ako se pH vrednost rastvora kreće u opsegu od 6,9 do 7,1 rastvor se može koristiti, a u suprotnom pH vrednost se koriguje dodavanjem nekoliko kapi 1N hlorovodonične kiseline ili 10N natrijum hidroksida.

Metoda:

- 1) Na analitičkoj vagi odmeriti 1-1,5g uzorka u filter lončice (m_1);
- 2) Izmeriti 0,5g natrijum sulfata u plastičnim tacnicama za merenje;
- 3) Dodati 0,5g natrijum sulfata u svaki filter lončić;
- 4) Filter lončići se postave u stalak koji je pričvršćen za aparat, prihvate se specijalnom viljuškom koja kao i stalak ima 6 mesta, nivelišu se, a zatim se pažljivo prenose i postavljaju se na aparat;
- 5) Pritiskom na dole na ručnu polugu na aparatu, filter lončići se instaliraju na kolone za hidrolizu;
- 6) Okretanjem poluge u levo za reagens R1, dodati 100ml predhodno zagrejanog rastvora (rastvor deterdženta za reagens 1 pH 6,9-7,1) i 2 ml dekalina;
- 7) Vratiti poluge za reagens 1 u početni položaj;
- 8) Pritiskom na dugme za grejač zagrejati smešu u kolonama do ključanja (Na komandnoj tabli aparata pritiskom na dugme „reagens” rastvori se zagrevaju pomoću grejača koji su postavljeni u plastične boce na aparatu);
- 9) Na časovniku aparata podesiti vreme ključanja na 60 minuta i kuvati uz ključanje 60 minuta;
- 10) Nakon isteka 60 minuta isključiti grejač;

- 11) Okretanjem poluge „vakuum” na gore na aparatu odfiltrirati rastvor, pa zatim ispratim toplom vodom koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu, a zagrejana je pritiskom „water” dugmeta uz neprekidno vakuum filtriranje;
- 12) Viljuškom prihvatiti filter lončice i osloboditi ih sa kolona, vratiti na stalak za filter lončice, iznivelisati i pažljivo preneti na deo aparata za hladnu filtraciju;
- 13) Ručnom polugom koja se nalazi na delu aparata za hladnu filtraciju fiksirati filter lončice;
- 14) Isprati tri puta acetonom;
- 15) Viljuškom prihvatiti filter lončice i oslobađanjem poluge preneti ih u stalak i nivelisati. Skinuti viljušku sa filter lončica i rukom ih preneti u Petri šolju;
- 16) Filter lončice zajedno sa Petri šoljom preneti u sušnicu koja je prethodno zagrejana na 105°C i sušiti do konstantne težine, odnosno 12 časova;
- 17) Osušene uzorke hladiti u eksikatoru 60 minuta i meriti na analitičkoj vagi (m_2);
- 18) Filter lončice sa uzorkom preneti u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa, da pepeo pobeli. Posle žarenja filter lončice mašicama pomeriti ka unutrašnjem delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom ih preneti u eksikator;
- 19) Filter lončice hladiti u eksikatoru 60 minuta i potom meiti na analitičkoj vagi (m_3).

Izračunavanje:

Sadržaj NDF-a na 100 g polaznog uzorka obračunati po sledećoj formuli:

$$\%NDF = \frac{(m_2 - m_3)}{m_1} \cdot 100 \quad (25)$$

gde je:

- m_1 - masa filter lončica sa uzorkom, (g);
- m_2 - masa filter lončica sa uzorkom posle sušenja, (g);
- m_3 - masa filter lončica sa uzorkom posle žarenja, (g);

$$\%NDF_{S.M.} = \frac{\%NDF}{M_S} \cdot 100 \quad (26)$$

ADF (skraćeno od *Acid Detergent Fibres*, vlakna nerastvorljiva u kiselim deterdžentima, engl), predstavlja najteže svarljivi deo hraniva i sastoji se od: celuloze i lignina. Hraniva koja sadrže više ADF-a imaju niže vrednosti sadržaja svarljive energije. Da bi se odredio sadržaj ADF-a u jednom uzorku iz njega je potrebno putem hidrolize odstraniti: skrob, šećere, proteine, masti, pektin hemicelulozu i pepeo žarenjem na 500°C.

Sadržaj ADF-a u uzorku može se direktno odrediti kuvanjem uzorka u reagensu 2 (R2) ili u ostatku uzorka nakon kuvanja u reagensu 1 (R1) ispranom i osušenom na 105°C prilikom određivanja sadržaja NDF-a.

Da bi se odredio sadržaj ADF-a u jednom uzorku iz njega je potrebno, putem hidrolize, odstraniti: proteine, skrob, lipide i svarljive ugljene hidrate.

Reagensi:

- koncentrovana sumporna kiselina;
- cetavlon (cetil-trimetilamonijum-bromid);
- dekalin;
- aceton;

Rastvor deterdženta za reagens 2 (R2):

- koncentrovana sumporna kiselina, 55,72 ml;
- cetavlon, 200,0 ml;
- destilovane vode do 2000,0 ml;

Krajnji normalitet sumporne kiseline je 1N.

Metoda:

- 1) Na analitičkoj vagi odmeriti 1-1,5 g uzorka u filter lončice;
- 2) Filter lončići se postavljaju u stalak koji je pričvršćen za aparat, prihvate se specijalnom viljuškom koja kao i stalak ima 6 mesta, nivelišu se, a zatim se pažljivo prenose i postavljaju na aparat;
- 3) Pritiskom na dole na ručnu polugu na aparatu filter lončići se instaliraju na kolone za hidrolizu;
- 4) Okretanjem poluge u desno za reagens R2, dodaje se 100 ml prethodno zagrejanog rastvora (rastvor deterdženta za reagens 2) i 2 ml dekalina;
- 5) Vratiti poluge za reagens 1 u početni položaj;

- 6) Pritiskom na dugme za grejač zagrejati smešu u kolonama do ključanja (Na komandnoj tabli aparata pritiskom na dugme „reagens" rastvori se zagrevaju pomoću grejača koji su postavljeni u plastične boce na aparatu);
- 7) Na časovniku aparata podesiti vreme ključanja na 60 minuta i kuvati uz ključanje 60 minuta;
- 8) Nakon isteka 60 minuta isključiti grejač;
- 9) Okretanjem poluge „vakuum" na gore na aparatu, odfiltrirati rastvor, pa zatim ispratim toplom vodom koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu, a zagrejana je pritiskom „water" dugmeta uz neprekidno vakum filtriranje;
- 10) Viljuškom prihvatiti filter lončice i osloboditi ih sa kolona, vratiti na stalak za filter lončice, iznivelisati i pažljivo preneti na deo aparata za hladnu filtraciju;
- 11) Ručnom polugom koja se nalazi na delu aparata za hladnu filtraciju fiksirati filter lončice;
- 12) Isprati tri puta acetonom;
- 13) Viljuškom prihvatiti filter lončice i oslobađanjem poluge preneti ih u stalak i nivelisati. Skinuti viljušku sa filter lončica i rukom ih preneti u Petri šolju;
- 14) Filter lončice zajedno sa Petri šoljom preneti u sušnicu koja je prethodno zagrejana na 105°C i sušiti do konstantne mase, odnosno 8 časova;
- 15) Osušene uzorke hladiti u eksikatoru 60 minuta i meriti na analitičkoj vagi;
- 16) Filter lončice sa uzorkom preneti u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa da pepeo pobeli. Posle žarenja filter lončice mašicama pomeriti ka unutrašnjem delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom ih preneti u eksikator;
- 17) Filter lončice hladiti u eksikatoru 60 minuta i potom meriti na analitičkoj vagi;
- 18) Sadržaj ADF-a na 100 g polaznog uzorka obračunati po sledećoj formuli;

Izračunavanje:

$$\%ADF = \frac{(m_1 - m_2)}{m_0} \cdot 100 \quad (27)$$

gde je:

- m_1 - masa filter lončica sa osušenim talogom, (g);
- m_2 - masa praznog filter lončica, (g);
- m_0 - masa odmerenog uzorka, (g);

Odnosno, preračunato na suhu materiju:

$$\%ADF_{S.M.} = \frac{\%ADF}{M_S} \cdot 100 \quad (28)$$

gde je:

- M_S - procenat suve materije u uzorku, (%);

ADL (skraćeno od *Acid Detergent Lignin*, lignin nerastvorljiv u kiselim deterdžentima, engl) predstavlja sadržaj lignina u uzorku.

Da bi se odredio sadržaj ADL-a u jednom uzorku iz njega je potrebno, putem hidrolize, odstraniti: proteine, skrob, šećere, masti, pektin, β -glukane, hemicelulozu, celulozu i pepeo žaarenjem na 500°C (Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 1990).

Reagensi:

- koncentrovana sumporna kiselina;
- cetavlon (cetil trimetilamonijum bromid);
- dekalin;
- aceton;

Rastvor deterdženta za reagens 2 (R2)

- koncentrovana sumporna kiselina, 55,72 ml;
- cetavlon, 200,0 ml;
- destilovane vode do 2000,0 ml;

Krajni normalitet sumporne kiseline je 1N.

Metoda:

- 1) Na analitičkoj vagi odmeriti 1-1,5g uzorka u filter lončiče;
- 2) Filter lončiči se postave u stalak koji je pričvršćen za aparat, prihvate se specijalnom viljuškom koja kao i stalak ima 6 mesta, nivelišu se, a zatim se pažljivo prenose i postavljaju se na aparat;
- 3) Pritiskom na dole na ručnu polugu na aparatu filter lončiči se instaliraju na kolone za hidrolizu;
- 4) Okretanjem poluge u desno za reagens R2, dodati 100 ml predhodno zagrejanog rastvora (rastvor deterdženta za reagens 2) i 2 ml dekalina;
- 5) Vratiti poluge za reagens 1 u početni položaj;
- 6) Pritiskom na dugme za grejač zagrejati smešu u kolonama do ključanja (Na komandnoj tabli aparata pritiskom na dugme „reagens" rastvori se zagrevaju pomoću grejača koji su postavljeni u plastične boce na aparatu);

- 7) Na časovniku aparata podesiti vreme ključanja na 60 minuta i kuvati uz ključanje 60 minuta;
- 8) Nakon isteka 60 minuta isključiti grejač;
- 9) Okretanjem poluge „vakuum“ na gore na aparatu, odfiltrirati rastvor, pa zatim ispratim toplom vodom koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu, a zagrejana je pritiskom „water“ dugmeta uz neprekidno vakum filtriranje;
- 10) Viljuškom prihvatiti filter lončice i oslobađanjem poluge preneti ih u stalak i nivelisati. Skinuti viljušku sa filter lončica i rukom ih preneti Petri šolju;
- 11) Filter lončice zajedno sa Petri šoljom preneti u sušnicu koja je prethodno zagrejana na 105°C i sušiti do konstantne težine, odnosno 8 časova;
- 12) Osušene uzorke hladiti u eksikatoru 60 minuta i meriti na analitičkoj vagi;
- 13) Filter lončice sa uzorkom preneti u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa da pepeo pobeli. Posle žarenja filter lončice mašicama pomeriti ka unutrašnje delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom ih preneti u eksikator;
- 14) Filter lončice hladiti u eksikatoru 60 minuta i potom meriti na analitičkoj vagi;
- 15) Nakon merenja u filter lončice sipati 72% sumpornu kiselinu (potopi se uzorak) i ostaviti tri sata da stoji uz povremeno mešanje sa staklenim štapićem;
- 16) Filter lončice ispirati najmanje tri puta u staklenu vakum bocu hladnom destilovanom vodom uz mešanje sa staklenim štapićem;
- 17) Špric bocom isprati ostatak uzorka sa zidova filter lončica i staklenog štapića;
- 18) Filter lončice preneti u Petri šolju, a potom staviti u sušnicu i sušiti na 105°C do konstantne mase (8 časova);
- 19) Osušene uzorke preneti u eksikator i hladiti 60 minuta, pa meriti na analitičkoj vagi;
- 20) Filter lončice sa uzorkom preneti u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa da pepeo pobeli. Posle žarenja filter lončice mašicama pomeriti ka unutrašnjem delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom ih preneti u eksikator;
- 21) Filter lončice hladiti u eksikatoru 60 minuta i potom meriti na analitičkoj vagi.

Izračunavanje:

Sadržaj ADL-a na 100g polaznog uzorka obračunati po sledećoj formuli:

$$\%ADL = m_1 - m_2 \quad (29)$$

gde je:

- m_1 - masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja, (g);
- m_2 - masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja, (g);

$$\%ADL_{S.M.} = \frac{\%ADL}{M_S} \cdot 100 \quad (30)$$

gde je:

- M_S - procenat suve materije u uzorku, (%);

Celuloza je jedan od strukturnih ugljenih hidrata ćelijskog zida biljaka koju razgrađuju mikroorganizmi u buragu preživara.

Hemiceluloza je polisaharidna frakcija ćelijskog zida biljaka. Slična je celulozi ali se samo delimično razlaže u buragu.

Sadržaj hemiceluloze i ceuloze se dobijaju računski prema formulama:

$$\text{Hemiceluloza(\%)} = \%NDF - \%ADF \quad (31)$$

$$\text{Ceuloza(\%)} = \%ADF - \%ADL \quad (32)$$

Sadržaj **bezazotnih ekstraktivnih materija** (skraćeno - BEM, u stranoj literaturi engl., *Nitrogen Free Extract* - NFE) izračunat je primenom jednačine (FAO, 2012):

$$\text{BEM} = 100 \% - (\% \text{ pepela} + \% \text{ ukupnih vlakana} + \% \text{ ulja} + \% \text{ proteina}) \quad (33)$$

Fiene i sar., (2006) su primenili analizu stepenaste regresije (stepwise regression analysis) 150 uzoraka suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama kako bi razvili jednačine za predviđanje sadržaja amino kiselina na osnovu sadržaja proteina, ulja i vlakana. Međutim, vrednosti kvadrata koeficijenta korelacije r^2 za nekoliko jednačina su niske (arginin, cistein, lizin i triptofan) što ukazuje da primena ovih jednačina ne omogućava precizno određivanje udela pojedinih amino kiselina u uzorcima džibre, ali je i pored toga našla prilično raširenu praktičnu primenu pa je korišćena i u ovom radu za procenu sadržaja amino kiselina u kukuruznoj džibri.

Tabela 5.4. Jednačine za predviđanje sadržaja pojedinih amino kiselina suve kukuruzne džibre na osnovu sadržaja proteina, ulja i vlakana (Fiene i sar., 2006)

Amino kiselina	Jednačina	r ²
Arginin	$Y = 0,07926 + 0,0398 \times \text{Proteini}$	0,48
Izoleucin	$Y = -0,23961 + 0,04084 \times \text{Proteini} + 0,01227 \times \text{Ulje}$	0,86
Leucin	$Y = -1,15573 + 0,13082 \times \text{Proteini} + 0,06983 \times \text{Ulje}$	0,86
Lizin	$Y = -0,41534 + 0,04177 \times \text{Proteini} + 0,00913 \times \text{Vlakna}$	0,45
Metionin	$Y = -0,17997 + 0,02167 \times \text{Proteini} + 0,01299 \times \text{Ulje}$	0,78
Cistein	$Y = 0,11159 + 0,01610 \times \text{Proteini} + 0,00244 \times \text{Ulje}$	0,52
TSAA	$Y = -0,12987 + 0,03499 \times \text{Proteini} + 0,05344 \times \text{Ulje} - 0,00229 \times \text{Ulje}^2$	0,76
Treonin	$Y = -0,05630 + 0,03343 \times \text{Proteini} + 0,02989 \times \text{Ulje} - 0,00141 \times \text{Ulje}^2$	0,87
Triptofan	$Y = 0,01676 + 0,0073 \times \text{Proteini}$	0,31
Valin	$Y = 0,01237 + 0,04731 \times \text{Proteini} + 0,00054185 \times \text{Ulje}^2$	0,81

Ukupna energija predstavlja celokupnu energiju hraniva. Meri se određivanjem količine toplote koja se oslobodi kada se hranivo potpuno oksiduje u kalorimetarskoj bombi.

Svarljiva energija označava količinu energije koju životinja može da iskoristi. Ona predstavlja razliku ukupne i fekalne energije. Međutim, u tu vrednost su samo delimično uračunati gubici energije tokom iskorišćenja hranljivih materija.

Metabolička energija predstavlja razliku svarljive energije i energije urina i gasovitih produkata varenja. Sadržaj svarljive (SE) i sadržaj metaboličke energije (ME) računati su na osnovu hemijskog sastava prema formulama (Spiehs i sar., 2002):

$$\text{SE} = 4151 - (122\% \text{ pepela}) + (23\% \text{ proteina}) + (38\% \text{ ulja}) - (64\% \text{ ukupnih vlakana}) \quad (34)$$

$$\text{ME} = \text{SE} \cdot [1,003 - (0,0021\% \text{ proteina})] \quad (35)$$

5.2.11. Laboratorijska metoda mokrog mlevenja zrna kukuruza

Za određivanje tehnoloških karakteristika odabranih hibrida kukuruza u skrobarskoj preradi korišćena je modifikovana laboratorijska metoda mokrog mlevenja 100 grama zrna (Eckoff i sar., 1996). Ovom laboratorijskom metodom mokrog mlevenja kukuruzno zrno se uspešno razdvaja na svoje osnovne konstituente: skrob, proteine (gluten), klicu i vlakna (mekinje). Ovaj tehnološki postupak predstavlja integralni proces više sukcesivnih operacija:

- močenje zrna u vodi za močenje koja sadrži 0,2% sumpor-dioksida na 50°C u trajanju od 48h,
- ručna separacija klice,
- mokro mlevenje otklicanog zrna (omotač + endosperm) u laboratorijskom mlin-blenderu,
- odvajanje mekinja filtracijom kroz sito prečnika otvora 0,5 mm,
- razdvajanje skrobne i glutenske frakcije na stolu za taloženje,
- ispiranje i sušenje skroba.

Pošto se zrno kukuruza ručno očisti (odvoje primese, oštećena i izlomljena zrna) i izmeri (100 g), sledi faza močenja koja se izvodi u kolonama sa protočnim duplikatorskim omotačem, pri temperaturi od 50°C koja se obezbeđuje termostatskom cirkulacijom. Kolone su sa oba kraja zatvorene gumenim čepovima kroz koje prolaze staklene cevčice koje omogućavaju konstantnu cirkulaciju vode za močenje koja se postiže peristaltičkom pumpom. U kolone se sipa kukuruzno zrno čije su zapremine prethodno izmerene menzutom (V_1). Zatim se doda rastvor sumpor-dioksida (voda za močenje) koja sadrži 0,2% SO_2 u odnosu 2:1, voda za močenje: kukuruzno zrno. Rastvor za močenje se priprema tako što se odmeri 4,5 g kalijum-metabisulfita i rastvori u normalnom sudu od 1000 ml. Uključi se peristaltička pumpa i močenje traje 48 sati. Nakon toga kolone se prazne, voda od močenja odvaja od namočenog kukuruza i u njoj se određuje sadržaj suve materije koji predstavlja sadržaj rastvorljivih materija kukuruznog zrna. Namočeni kukuruz se sipa u istu menzuru kojom je merena zapremina zrna pre močenja i očita zapremina namočenog zrna (V_2).

Klica se skalpelom odvaja ručno, 24 sata suši na vazduhu a zatim u sušnici na 105°C.

Otklicano zrno se melje na laboratorijskom mlinu 3 minuta. Pre početka mlevenja otklicanom zrnu se doda vode u odnosu 1:3, zrno:voda.

Dobijena suspenzija se prosejava na situ od 0,5 mm. Tek u završnoj fazi ispiranja, sita se priključe na vakuum bocu da bi se olakšalo prosejavanje mekinje se tokom prosejavanja konstantno ispiraju malim količinama vode da bi se sav skrob i gluten izdvojili. Kao rezultat prosejavanja kao prelaz na situ se dobijaju mekinje, a kao prolaz suspenzija skroba i glutena. Mekinje se vazdušno suše 24 sata, a zatim u sušnici na 105°C.

Razdvajanje skrobne i glutenske frakcije je jedna od najosetljivijih faza mokre prerade kukuruza. Za taloženje skroba, u primenjenoj metodi, korišćeni su aluminijumski stolovi tzv. kanali specijalne konstrukcije (dužine 2 m) postavljeni pod nagibom od 4°. Skrob se kao frakcija veće specifične mase taloži dok lakši gluten kao suspenzija otiče i sliva se sa kraja stola u postavljenu posudu.

Skrob-glutenska suspenzija iz boce sa slavinom koja je postavljena iznad „taložnog stola“ se podesi da kaplje u konstantnom dotoku na gornji deo stola (kap po kap). Po završenom taloženju, u bocu se doda 100 ml čiste vode i pusti da iskaplje na istaloženi skrob kako bi se isparao gluten koji je zaostao na površini. Izdvojeni skrob se na stolu vazdušno suši 24 sata, a zatim se špatulicom i četkicom pažljivo kvantitativno ukloni sa stola, izmeri i suši u sušnici na 105°C. Pošto se gluten iz retke suspenzije istaloži (preko noći u frižideru), procesna voda se odlije da bi se odredio sadržaj suve materije odnosno gubitak nastao u ovom procesu. Gluten se izlije u Petri šolje i upari na 60°C, ostavi da stoji 24h, meri i potom melje radi određivanja sadržaja vlage i proteina.

Povećanje zapremine u procesu močenja se izračunava na osnovu razlike zapremina V_2 i V_1 i izrazi procentualno.

Suva materija u vodi od močenja i u procesnoj vodi se dobija uparavanjem i sušenjem alikvota od 50 ml i preračunavanjem na ukupnu zapreminu. Izražava se procentualno.

Masa svake frakcije (mekinje, klica, skrob, gluten) se izmeri posle vazdušnog sušenja od 24 sata i masa posle sušenja u sušnici i iz razlike ove dve mase izračuna se vlaga dobijene frakcije kao i prinosi u odnosu na polaznu količinu suve materije zrna.

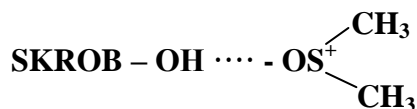
Iskorišćenje skroba je procentualni udeo dobijenog skroba u odnosu na količinu ukupno prisutnog skroba u zrnu (u % računatim na suhu materiju). Iz tog razloga je neophodno odrediti i sadržaj skroba po Eversu u celom zrnu.

Sadržaj proteina u skrobu se određuje metodom po Kjeldalu.

5.2.12. Određivanje sadržaja amiloze i amilopektina

Za određivanje sadržaja amiloze i amilopektina u izolovanim kukuruznim skrobovima korišćena je novija modifikovana kolorimetrijska metoda (McGrance, 1998). Specifičnost ove metode je što se koristi dimetil-sulfoksid (DMSO) za rastvaranje skroba umesto natrijum-hidroksida i etanola. Rastvaranje skroba u anhidrovanom DMSO-u na sobnoj temperaturi teče sporo, i do nekoliko dana, a može

biti nepotpuno. Zagrevanjem ili dodavanjem 5-15% vode u DMSO značajno se povećava rastvorljivost skroba a još uvek nema tačnog objašnjenja zašto male količine vode značajno povećavaju sposobnost DMSO-a kao rastvarača (Whistler i sar., 1984). Skrobne granule ne bubre u DMSO-u. One se rastvaraju više površinskom erozijom ili fragmentacijom granula. DMSO kao jak akceptor vodonika raskida vodonične veze kako u polisaharidu, tako i u vodi.



Postupak za određivanje sadržaja amiloze se sastoji u preciznom merenju uzorka skroba (0,1 g) i rastvaranju u DMSO-u (2 ml), zagrevanju na vodenom kupatilu u trajanju od 20 minuta na temperaturi od 90°C. Nakon rastvaranja ovaj rastvor se razblažuje destilovanom vodom do 25 ml. Alikvot rastvora (1 ml) se potom razblažuje sa 50 ml vode, 5 ml rastvora joda (0,0025 mol/l) u kalijum-jodidu (0,0065 mol/l), mućka i meri apsorbancu pomoću spektrofotometra podešenog na talasnu dužinu $\lambda=600$ nm. Ukoliko se uoči замуćenje, rastvoru skroba treba dodati oko 5 ml vode, ponovo zagrevati oko 15 minuta te brzo ohladiti pre dodavanja ostatka vode i jodnog reagensa. Boja momentalno postiže maksimalan intenzitet i postojana je najmanje narednih 24 sata.

Konstruiše se standardna kriva za smešu amiloze i amilopektina koja sadrži: 0,10,25,50,75 i 100% amiloze. U eksperimentima je kao standard korišćena krompirova amiloza i kukuruzni amilopektin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Krompirova amiloza ima apsorpcioni maksimum na 636 nm, a kukuruzna amiloza na 604 nm (McGrance i sar., 1998), što se smatra zanemarljivom razlikom. U UV-vidljivom delu spektra jodni kompleksi amiloze i amilopektina imaju pikove koji su veoma široki, tako da nije neophodno za kvantitativno određivanje amiloze koristiti apsorpcioni maksimum. Talasna dužina od 600 nm je pogodna za određivanje kukuruzne i krompirove amiloze.

Primenjena metoda za određivanje sadržaja amiloze može se primeniti kod raznih botaničkih vrsta skroba. Mogu se ispitati uzorci skrobova sa visokim i niskim sadržajem amiloze uz određene izmene u zapremini alikvota kako bi se dobio optimalan rezultat. Osetljivost jod-skrobne reakcije je veoma velika a primenljiva je za količinu skroba koja sadrži manje od 100 μg amiloze (Milašinović, 2005).

5.2.13. Korelaciona analiza

Korelaciona analiza se bavi ispitivanjem zavisnosti, odnosno stepena slaganja između dve promenljive, kada se ne može odrediti koja je zavisno a koja nezavisno promenljiva. Stepenn slaganja između dve promenljive u linearnoj međuzavisnosti izražava se Pirsonovim (Pearson) koeficijentom korelacije (r) čije vrednosti se kreću u rasponu od -1 do 1 ($r = -1$ označava 100% negativnu korelacionu zavisnost, $r = +1$ označava 100% pozitivnu korelacionu zavisnost između ispitivanih parametara). Ovaj koeficijent je određivan pomoću softvera za statistiku IBM SPSS Statistics 20.

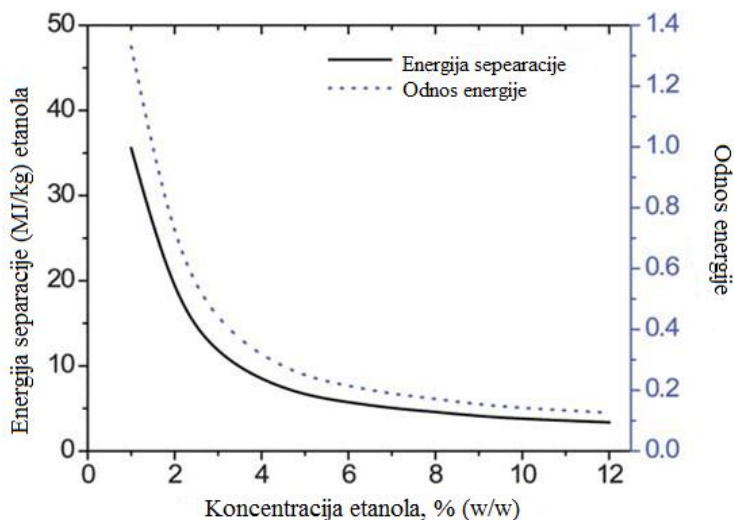
5.2.14. Proračun energetske vrednosti

U proračunima energetske vrednosti su korišćeni podaci za energije sagorevanja pojedinih komponenata po kilogramu suve materije koje su predložili Domalski i saradnici (1986) (tabela 5.5). Dobijene vrednosti su poredene sa drugim literaturnim podacima (Pimentel 2003; Patzek, 2005)

Tabela 5.5. Vrednosti energije sagorevanja pojedinih sirovina i komponenata korišćene u proračunima (Domalski i sar., 1986)

Sirovina	Energija sagorevanja, kJ kg⁻¹
Etanol	29700
Kukuruzna krupica	15995
Kukuruzni skrob	17570
Kukuruzno ulje	39500
Gluten	24258
Kočanka	18770
Celuloza	17400

Smanjenje energije sagorevanja nakon prečišćavanja bioetanola do koncentracije koja zadovoljava standarde za goriva (minimalno 99,5% etanola) računato je pomoću dijagrama prikazanog na slici koji su predložili Huang i Zhang (2011).



Slika 5.6. Odnos između energije destilacije etanola i koncentracije etanola dobijen iz literaturnih podataka (Huang i Zhang, 2011)

5.2.15. Proračun troškova proizvodnje kukuruza i bioetanola

U proračunu troškova proizvodnje kukuruza po hektaru obradive površine korišćeni su podaci o cenama pojedinih operacija, troškovima goriva i cenama semenskog kukuruza, đubriva i herbicida. Računato je da su u fazama osnovnog i predsetvenog đubrenja korišćeni preparati NPK 8:24:16 (neorgansko đubrivo, izvor azota, fosfora i kalijuma) i urea (azotno đubrivo). Za tretiranje zemljišta herbicidom troškovi su računati za preparat Merlin[®] flexx, selektivni translokacioni herbicid namenjen suzbijanju jednogodišnjih širokolisnih i uskolisnih korova koji se primenjuje posle setve, a pre nicanja useva i korova najkasnije do razvoja trećeg lista kukuruza. Za korektivno prskanje troškovi su računati za herbicid Monsoon[®] active, selektivni translokacioni herbicid za suzbijanje višegodišnjih i jednogodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova kada je kukuruz u fazi 2-8 listova.

U proračunu troškova proizvodnje bioetanola korišćeni su podaci o troškovima proizvodnje u postrojenjima u SAD (Mousdale, 2008). Proračun je aproksimiran za idealan slučaj da u Srbiji postoji proizvodni pogon koji je trenutno u funkciji.

6. REZULTATI I DISKUSIJA

6.1. FIZIČKE KARAKTERISTIKE I HEMIJSKI SASTAV ZRNA ISPITIVANIH HIBRIDA KUKURUZA

6.1.1. Fizičke karakteristike zrna i klipa ispitivanih hibrida kukuruza

Rezultati određivanja fizičkih karakteristika 27 ZP hibrida kukuruza, različite genetičke osnove i različite dužine vegetacije prikazane su u tabelama 6.1, 6.2. i 6.3. U tabeli 6.1. su predstavljene fizičke osobine klipa ispitivanih hibrida kukuruza.

Tabela 6.1. Fizičke karakteristike klipa ispitivanih hibrida kukuruza

Genotip	Dužina klipa, cm	Masa klipa, g	Broj redova	Broj zrna	Masa koćanke, g	Masa zrna, g
ZP 172/8	18,05	185,17	14,6	609,5	30,44	154,73
ZP 243	20,40	230,23	16,3	609,6	36,71	193,49
ZP 341	21,53	281,43	14,6	604,1	41,31	240,33
ZP 362	20,03	283,70	14,7	599,5	45,78	237,92
ZP 377	20,40	274,47	15,2	609,7	40,48	233,99
ZP 434	21,53	296,62	14,7	599,5	43,07	253,56
ZP 444	21,85	329,61	16,6	690,6	51,96	283,37
ZP 484	20,85	313,14	15,5	712,0	47,24	265,91
ZP 505	23,05	309,13	15,7	716,25	45,18	263,95
ZP 548	20,66	305,65	15,2	682,6	47,09	256,73
ZP 560	20,40	361,54	15,7	714,0	49,33	296,72
ZP 574/8	19,23	277,96	15,2	552,3	46,16	231,80
ZP 600	21,90	314,48	14,0	565,8	48,62	265,87
ZP 606	22,10	322,59	13,7	591,25	46,75	275,84
ZP 611k	18,43	119,07	15,5	553,9	22,06	97,01
ZP 620b	21,80	330,81	15,1	663,8	58,46	272,35
ZP 633	19,23	278,37	15,9	635,2	38,40	239,97
ZP 666	22,88	323,79	15,7	678,0	41,76	282,02
ZP 677	21,07	315,73	15,7	672,0	51,74	264,01
ZP 704wx	21,85	292,39	14,6	728,9	40,51	251,87
ZP 74b	22,03	306,94	14,5	648,8	60,77	246,22
ZP 747	21,53	336,63	16,4	682,3	52,31	284,82
ZP 749	23,63	331,67	14,1	621,3	60,18	271,49
ZP 789	22,88	309,67	14,3	625,4	45,81	262,52
ZP 808	23,80	320,51	16,0	753,2	51,34	269,18
ZP 877	21,10	326,65	14,8	618,0	48,79	277,87
ZP Rumenska	21,80	281,05	16,6	622,0	52,93	228,14
Minimum	18,05	119,07	13,7	552,3	22,06	97,01
Maksimum	23,8	361,54	16,6	753,2	60,77	296,72
SD	1,45	49,52	0,80	54,76	8,45	42,26
Prosek	21,26	294,78	15,22	642,94	46,12	248,21

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.1. može se videti da vrednosti fizičkih svojstava klipa odabranih hibrida kukuruza variraju u manjoj ili većoj meri. Vrednosti pojedinih parametara kretale su se u rasponu od 18,05 do 23,8 cm za dužinu klipa; masa klipa 119,07-361,54 g; broj redova 13,7-16,6; broj zrna 552,3-753,2; masa koćanke 22,06-60,77 g i masa zrna 97,01-296,72 g. U tabeli 6.1. se uočava da je najveće standardno odstupanje (devijacija) za broj zrna (54,76), a najmanje za broj redova (0,80).

U tabeli 6.2. prikazane su fizičke karakteristike zrna ispitivanih hibrida kukuruza.

Tabela 6.2. Fizičke karakteristike zrna ispitivanih hibrida kukuruza

Genotip	AM	HM	G	IF	OM	TF	MF	IAV
ZP 172/8	241,19	829,32	1,27	14,02	14,87	60,27	39,73	0,244
ZP 243	292,89	749,20	1,20	92,70	10,27	57,14	42,86	0,253
ZP 341	351,98	785,89	1,24	40,53	9,97	58,46	41,54	0,262
ZP 362	363,32	777,53	1,25	51,92	10,93	58,98	41,02	0,228
ZP 377	332,30	776,33	1,28	35,02	13,33	57,58	42,42	0,255
ZP 434	384,45	778,31	1,26	39,77	12,03	56,69	43,31	0,253
ZP 444	376,72	797,95	1,30	8,94	11,17	59,59	40,41	0,258
ZP 484	337,07	824,75	1,31	5,35	11,57	60,76	39,24	0,276
ZP 505	315,81	846,84	1,30	0,97	13,87	64,45	35,55	0,236
ZP 548	342,36	808,81	1,24	69,41	9,47	51,60	48,40	0,254
ZP 560	383,20	808,33	1,29	8,02	9,47	62,12	37,88	0,251
ZP 574/8	363,54	758,83	1,27	32,0	10,07	61,63	38,37	0,240
ZP 600	419,93	781,52	1,29	17,30	12,3	59,71	40,29	0,215
ZP 606	414,49	773,55	1,28	34,6	14,33	59,21	40,79	0,226
ZP 611k	153,77	919,41	1,35	0,35	18,77	73,99	26,01	0,215
ZP 620b	369,95	793,21	1,28	30,51	13,07	62,85	37,15	0,241
ZP 633	343,46	804,01	1,30	6,86	12,8	64,17	35,83	0,226
ZP 666	367,77	788,52	1,27	28,76	13,3	58,36	41,64	0,237
ZP 677	350,86	791,26	1,28	20,23	11,9	61,09	38,91	0,223
ZP 704wx	319,20	780,72	1,25	53,73	10,50	65,69	34,31	0,195
ZP 74b	335,04	781,03	1,28	6,12	13,5	64,33	35,67	0,275
ZP 747	355,07	740,46	1,24	70,02	11,43	54,48	45,52	0,257
ZP 749	371,85	770,86	1,26	43,85	11,27	59,40	40,60	0,265
ZP 789	369,12	785,44	1,28	21,18	10,0	60,34	39,66	0,231
ZP 808	324,99	791,71	1,26	59,13	11,3	58,19	41,81	0,250
ZP 877	423,30	783,50	1,27	28,22	10,57	60,78	39,22	0,239
ZP Rumenska	311,11	820,60	1,25	29,32	13,71	60,22	39,78	0,246
Minimum	153,77	740,46	1,20	0,35	9,47	51,6	26,01	0,195
Maksimum	423,3	919,41	1,35	92,7	18,77	73,99	48,4	0,276
SD	54,55	34,30	0,028	23,47	2,04	4,08	4,08	0,019
Prosek	344,99	793,33	1,27	31,44	12,07	60,45	39,55	0,24

*AM–apsolutna masa, (g); HM–hektolitarska masa, ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$); G–gustina, ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$); IF–indeks flotacije (%); OM–otpornost na mlevenje, (s); TF - udeo tvrde frakcije endosperma (%); MF – udeo meke frakcije endosperma (%); IAV– indeks apsorpcije vode.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.2. može se videti da se masa 1000 zrna ili apsolutna masa, kao fizički kriterijum kvaliteta, kretala u rasponu od 153,77 g (ZP 611k) do 423,30 g (ZP 877). Ona je pokazala i najveću standardnu devijaciju (54,55) u odnosu na ostale fizičke karakteristike zrna. Kod ispitivanih ZP genotipova hektolitarska ili zapreminska masa, najstariji standardni i lako merljivi pokazatelj kvaliteta kukuruznog zrna, kretala se u rasponu od 740,46 kg·m⁻³ (ZP 747) do najviše 919,41 kg m⁻³ (ZP 611k). Hektolitarska masa imala je manje standardno odstupanje među hibridima (34,30 kg m⁻³) od apsolutne mase.

Gustina zrna ispitivanih hibrida varirala je od 1,20 gcm⁻³ kod genotipa ZP 243 do 1,35 gcm⁻³ kod genotipa ZP 611k. Na smanjenje gustine endosperma, a samim tim i gustine celog zrna, utiče mala zbijenost skrobnih granula i postojanje međuprostora. Indeks flotacije kretao se od 0,35% (ZP 611k) do 92,70% (ZP 243).

Otpornost na mlevenje i udeo tvrde i meke frakcije endosperma predstavljaju parametre tvrdoće zrna koji posmatrano sa aspekta primene kukuruza u industriji, a posebno u skrobarskoj preradi, predstavljaju njegovo najbitnije fizičko svojstvo. Tvrdoća i čvrstina zrna su tesno povezane sa odnosom tvrdog (staklastog, rožnatog) i mekog (brašnatog) endosperma (Milašinović, 2005). Udeo tvrde i meke frakcije u zrnu zavisi od genotipa i uslova sredine. Odnos tvrde i meke frakcije je veći kod kukuruza tvrdunaca nego kod zubana i najčešće se povećava sa zrelošću zrna i udelom azota (Owens, 2005). Rezultati otpornosti na mlevenje dobijeni u ovim ispitivanjima kretali su se od 9,47 s za ZP 548 i ZP 560 do 18,77 s za ZP 611k. Sličnu tendenciju pokazuju udeo tvrde i meke frakcije endosperma u ukupno samlevenom materijalu. Udeo tvrde frakcije kretao se u rasponu od 51,60% (ZP 548) do 73,99% (ZP 611k), a meke od 26,01% (ZP 611k) do 48,40% (ZP 548). Rezultati pokazuju da je indeks apsorpcije vode kod ispitivanih genotipova bio u intervalu od 0,195 za genotip ZP 704 wx do 0,276 za genotip ZP 484.

U tabeli 6.3. je prikazani su rezultati ispitivanja strukture, odnosno udela fizičkih delova zrna ispitivanih ZP hibrida kukuruza. Analize strukture zrna urađene ručnom disekcijom pokazale su da se sazrelo zrno ispitivanih genotipova sastoji od 5,03% (ZP 600) do 9,68% (ZP 611k) omotača (perikarpa), od 10,06% (ZP 611k) do 14,22% (ZP Rumenka) klice i od 77,78% (ZP Rumenka) do 83,08% (ZP 633) endosperma.

Tabela 6.3. Struktura zrna ispitivanih hibrida kukuruza

Genotip	Perikarp, %	Klica, %	Endosperm, %
ZP 172/8	5,44	12,41	82,15
ZP 243	5,07	12,48	82,45
ZP 341	7,26	12,30	80,44
ZP 362	5,49	12,08	82,43
ZP 377	7,00	12,25	80,75
ZP 434	7,02	12,11	80,87
ZP 444	6,63	13,52	79,85
ZP 484	7,45	12,80	79,75
ZP 505	6,20	12,76	81,04
ZP 548	5,78	12,02	81,20
ZP 560	6,44	13,25	80,31
ZP 574/8	5,91	12,36	81,73
ZP 600	5,03	12,80	82,17
ZP 606	5,81	11,37	82,82
ZP 611k	9,68	10,06	80,26
ZP 620b	6,00	13,94	80,06
ZP 633	5,56	11,36	83,08
ZP 666	6,45	12,51	81,04
ZP 677	6,20	11,80	82,00
ZP 704wx	5,76	13,40	80,84
ZP 74b	7,05	11,64	81,31
ZP 747	6,42	13,35	80,23
ZP 749	6,15	12,14	81,71
ZP 789	6,00	12,08	81,92
ZP 808	6,23	11,75	82,02
ZP 877	5,55	11,92	82,53
ZP Rumenka	8,00	14,22	77,78
Minimum	5,03	10,06	77,78
Maksimum	9,68	14,22	83,08
SD	0,98	0,87	1,17
Prosek	6,35	12,40	81,21

Na osnovu prikazanih rezultata fizičkih karakteristika zrna 27 ZP hibrida kukuruza može se zaključiti da hibridi ZP 243, ZP 548 i ZP 747 sa povećanim udelom meke frakcije endosperma (42,86; 48,40 i 45,52, respektivno) i najvišim vrednostima za indeks flotacije (preko 60%) pripadaju grupi hibrida mekog endosperma. Hibridi se prema dobijenim vrednostima za indeks flotacije (30-60%) mogu svrstati u hibride srednje tvrdoće endosperma: ZP 341, ZP 362, ZP 377, ZP 434, ZP 574/8, ZP 606, ZP 620 b, ZP 704 wx, ZP 749 i ZP 808, dok su hibridi koji pripadaju grupi hibrida tvrdog endosperma (IF ~10-30%): ZP 172/8, ZP 600, ZP 677, ZP 789, ZP 877 i ZP Rumenka. Hibridi sa veoma tvrdim endospermom (IF<10%) su: ZP 444, ZP 484, ZP 505, ZP 560, ZP 611k, ZP 633 i ZP 74b.

6.1.2. Hemijski sastav zrna ispitivanih hibrida kukuruza

U tabeli 6.4. su prikazani rezultati ispitivanja osnovnog hemijskog sastava zrna hibrida korišćenih u eksperimentima.

Tabela 6.4. Hemijski sastav zrna ispitivanih hibrida kukuruza

Genotip	Sadržaj suve materije, %	Sadržaj vlage, %	Sadržaj skroba, %	Sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata, %	Sadržaj proteina, %	Sadržaj ulja, %	Sadržaj sirove celuloze, %	Sadržaj pepela, %
ZP 172/8	90,20	9,80	72,85	0,30	9,35	7,15	2,06	1,44
ZP 243	88,89	11,11	73,50	0,66	9,40	6,23	1,98	1,25
ZP 341	88,04	11,96	70,40	0,20	9,75	6,28	2,33	1,34
ZP 362	87,42	12,58	74,61	0,25	9,29	6,07	2,22	1,32
ZP 377	87,31	12,69	72,57	0,25	9,90	6,31	2,34	1,42
ZP 434	88,44	11,56	72,04	0,10	10,15	6,02	2,42	1,40
ZP 444	88,06	11,94	72,25	0,36	9,39	6,56	2,28	1,35
ZP 484	89,36	10,64	69,60	0,40	10,05	7,32	2,47	1,44
ZP 505	88,86	11,14	73,38	0,40	9,88	6,38	2,21	1,31
ZP 548	90,19	9,81	72,04	0,40	9,19	6,08	1,97	1,41
ZP 560	88,54	11,46	72,39	0,10	9,63	5,79	2,58	1,35
ZP 574/8	86,64	13,36	72,07	0,21	10,76	4,76	2,37	1,52
ZP 600	86,78	13,22	74,42	0,35	10,19	5,06	2,43	1,42
ZP 606	87,26	12,74	73,16	0,25	10,22	5,45	2,14	1,40
ZP 611k	91,26	8,78	68,57	0,44	13,25	5,36	2,56	1,45
ZP 620b	88,00	12,00	73,31	0,15	9,59	5,74	2,26	1,35
ZP 633	88,43	11,57	73,55	0,93	9,82	6,34	2,23	1,40
ZP 666	87,90	12,10	74,26	0,16	9,42	5,55	2,46	1,26
ZP 677	88,29	11,71	74,67	0,41	9,07	5,00	2,50	1,36
ZP 704 _{wx}	89,13	10,87	74,13	0,37	10,30	5,71	2,26	1,51
ZP 74b	86,64	13,36	74,94	0,16	9,12	5,88	2,72	1,21
ZP 747	86,92	13,08	74,08	0,21	9,31	7,18	2,39	1,36
ZP 749	86,84	13,16	73,46	0,21	10,11	5,52	2,14	1,30
ZP 789	87,47	12,53	73,66	0,47	9,93	5,50	2,40	1,35
ZP 808	88,12	11,88	74,55	0,16	8,86	5,24	2,33	1,28
ZP 877	88,52	11,48	74,68	0,41	9,77	5,26	2,21	1,30
ZP Rumenka	91,40	8,60	65,38	1,01	11,54	7,08	2,22	1,58
Minimum	86,64	8,6	65,38	0,1	8,86	4,76	1,97	1,21
Maksimum	91,4	13,36	74,94	1,01	13,25	7,32	2,72	1,58
SD	1,30	1,30	2,15	0,22	0,88	0,69	0,18	0,085
Prosek	88,33	11,67	72,76	0,34	9,90	5,96	2,31	1,37

Sadržaj vlage kretao se u rasponu od 8,60% (ZP Rumenka) do 13,36% (ZP 574/8). Sadržaj skroba bio je najniži kod hibrida ZP Rumenka (65,38%) a najviši kod ZP 74b (74,94%), dok se sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata kretao u rasponu od 0,1% (ZP 434 i ZP 560) do 1,01% (ZP Rumenka). U svom radu Gulati i sar., (1996) navode da se iz kilograma kukuruza sadržaja vlage 15,5% koji sadrži prosečno oko 0,61 kg skroba i 0,022 kg rastvorljivih ugljenih hidrata teorijski moglo proizvesti 0,50 l etanola, pod uslovom da se svi ugljeni hidrati idealno razlože do glukoze. U tom slučaju bi 0,44 l etanola poticalo iz skroba, 0,014 l iz rastvorljivih ugljenih hidrata, 0,034 l iz celuloze i 0,015 l iz hemiceluloze. To znači da se može smatrati da pored skroba i rastvorljivi ugljeni hidrati koji se nalaze u zrnju kukuruza utiču na prinos bioetanola (oko 2,8% od ukupnog prinosa prema Gulatiju i saradnicima).

Sadržaj proteina u zrnju kretao se od 8,86% (ZP 808) do 13,25% (ZP 611k). Procentualni udeo ulja u zrnju ispitivanih hibrida kukuruza kretao se od 4,76% (ZP 574/8) do 7,32% (ZP 484). Sadržaj celuloze se kretao u rasponu od 1,97 (ZP 548) do 2,72 (ZP 74b), a pepela od 1,21 (ZP 74b) do 1,58 (ZP Rumenka).

Rezultati fizičkih karakteristika i hemijskog sastava zrna ZP hibrida kukuruza u skladu su sa ranije objavljenim rezultatima ispitivanja (Radosavljević i sar., 2009, 2008) koji se odnose na uzorke ZP hibrida čija je setva bila u različitim vremenskim periodima.

Većina ispitanih hibrida sadrži veliki udeo skroba u zrnju, preko 70%, što je jedan od glavnih preduslova za ostvarenje visokih prinosa bioetanola u procesima dvojno-enzimske hidrolize i fermentacije. Pretpostavka je da će povišen udeo meke frakcije (preko 40%) kod pojedinih hibrida takođe pozitivno uticati na visoke prinose bioetanola kao i na izdvajanje skroba u laboratorijskoj metodi mokrog mlevenja kukuruznog zrna. Sadržaj proteina, ulja, i celuloze trebalo bi pozitivno da utiče na kvalitet sporednih proizvoda dobijanja etanola (hraniva) koji se koriste kao komponente u smešama za ishranu domaćih životinja.

Genetička varijabilnost ispitanih hibrida kukuruza ukazuje na raznovrsne mogućnosti njihove tehnološke prerade i primene u svim sferama života: počev od ishrane ljudi i životinja, preko primene u proizvodnji biogoriva i biorazgradljivih materijala, farmaciji, medicini i raznim granama industrije.

6.2. PROIZVODNJA BIOETANOLA OD KUKURUZNOG ZRNA

6.2.1. Optimizacija procesa dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza

U eksperimentima koji su vršeni u cilju određivanja optimalnih uslova odvijanja procesa dvojno-enzimske hidrolize korišćeno je brašno dobijeno mlevenjem celog zrna hibrida ZP 633, polutvrdunca žute boje i standardnog hemijskog sastava zrna. Ovaj hibrid spada u srednje kasne hibride (grupa zrenja FAO 600), poseduje izuzetan kvalitet zrna i potencijal rodosti preko 11 t ha⁻¹.

6.2.1.1. Ispitivanje uticaja koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon utečnjavanja skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri različitim hidromodulima

Određivan je uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon utečnjavanja (likvefakcije) skroba iz brašna celog zrna kukuruza, pri različitim hidromodulima: 1:2,5, 1:3 i 1:4. U eksperimentima je korišćeno kukuruzno brašno dobijeno mlevenjem celog zrna hibrida ZP 633, sadržaja skroba 73,55% (određen polarimetrijskom metodom po Eversu) i sadržaja suve materije 88,43%. Hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4 odgovaraju početne koncentracije skroba 210,14 g l⁻¹, 183,88 g l⁻¹ i 147,10 g l⁻¹, respektivno (tabela 6.5). Koncentracija enzima je izražena u % (ml enzima na 100g brašna).

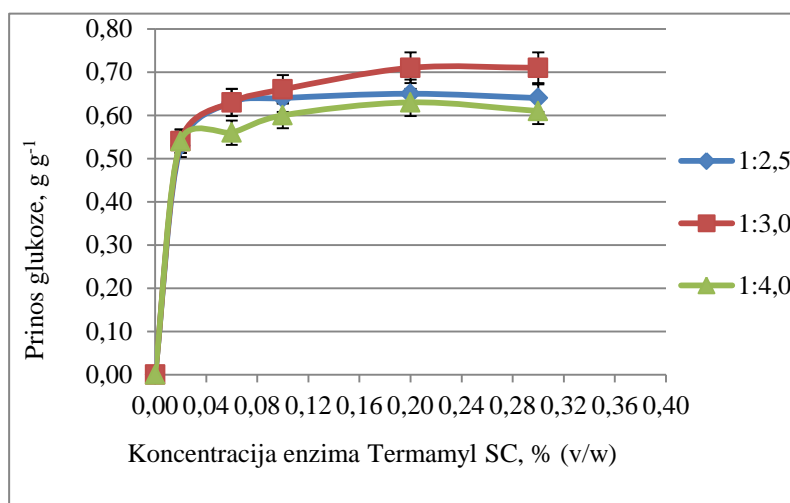
Tabela 6.5. Parametri skrobne suspenzije brašna celog zrna hibrida ZP 633 pri različitim hidromodulima

Hidromodul	Zapremina suspenzije, V_{suspenzije}, ml	Početna koncentracija skroba, g l⁻¹	Početna koncentracija glukoze, g l⁻¹
1:2,5	140	210,14	233,47
1:3	160	183,88	204,29
1:4	200	147,10	163,43

Nakon završene faze utečnjavanja merena je koncentracija nastale glukoze, a rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 6.6. i na slici 6.1.

Tabela 6.6. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon utečnjavanja skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633 pri različitim hidromodulima

Koncentracija enzima Termamyl SC, %(v/w)	Koncentracija glukoze, g l ⁻¹			Prinos glukoze, g g ⁻¹		
	1:2,5	1:3	1:4	1:2,5	1:3	1:4
0,02	111,88	99,55	78,88	0,53	0,54	0,54
0,06	133,09	116,34	82,33	0,63	0,63	0,56
0,10	135,02	122,13	88,73	0,64	0,66	0,60
0,20	136,58	131,39	92,58	0,65	0,71	0,63
0,30	134,26	130,86	90,17	0,64	0,71	0,61



Slika 6.1. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu prinosa glukoze nakon utečnjavanja skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633 pri različitim hidromodulima

Kao što se može zaključiti iz rezultata prikazanih u tabeli 6.6. i na slici 6.1, pri svakom hidromodulu, sa povećanjem koncentracije enzima Termamyl SC povećava se koncentracija i prinos glukoze. Pri koncentracijama enzima višim od 0,10% (v/w) ne dolazi do značajnijih promena u koncentraciji i prinosu nastale glukoze. Pri hidromodulu 1:3 ostvaruju se najviše vrednosti prinosa glukoze (slika 6.1). Takođe, dostignute vrednosti prinosa glukoze pri hidromodulima 1:2,5 i 1:4 i koncentracijama enzima višim od 0,10% (v/w) ne razlikuju se značajno. Iako je pri hidromodulu 1:2,5 početna koncentracija skroba u suspenziji najviša, pri ovakvom sastavu suspenzije nisu postignuti najveći prinosi glukoze. To se može objasniti velikim viskozitetom suspenzije, nezanemarljivim otporima prilikom mešanja kao i inhibicijom enzima usled visoke koncentracije supstrata i nastale glukoze.

Želatinizacija i utečnjavanje skroba se u industriji najčešće izvode simultano dodavanjem termostabilne α -amilaze pre želatinizacije u cevnom reaktoru (*jet cooker*) (Baks, 2007). Koncentracija skroba tokom ovog procesa je ograničena na 30–35 w/w % suve materije, zato što se veće koncentracije ne mogu tretirati u ovom tipu reaktora. Međutim, povećanje koncentracije skroba u toku želatinizacije i enzimske hidrolize bi moglo da utiče na povećanje zapreminske produktivnosti, i stabilnosti enzima (De Cordt i sar., 1994), kao i smanjenje troškova za energiju (Grafelman i Meagher, 1995).

Pored prednosti veće koncentracije supstrata kojom se eventualno može postići veća koncentracija i produktivnost bioetanola, to takođe dovodi i do porasta viskoziteta reakcione smeše. Kao posledica toga, reaktori koji se inače koriste u industriji za smeše skroba od 30–35 w/w % suve materije ne mogu se koristiti za tretiranje koncentrovanijih smeša skroba te se stoga moraju koristiti drugi tipovi reaktora.

Pokazalo se da su ekstruderi uspešni u preradi koncentrovanih smeša skroba. Oni se primenjuju u neenzimskim tretmanima skroba (Blanche i Sun, 2004; Jackson i sar., 1990; Zheng i Wang, 1994) i enzimskim tretmanima skroba (Ćurić i sar., 1998; Lee i Kim, 1990; Vasanthan i sar., 2001). S obzirom da nije izvodljivo ostvariti dugo vreme zadržavanja u ekstruderu, nije moguće ni proizvesti hidrolizate visokog dekstroznog ekvivalenta (preko 25) bez primene visokih koncentracija enzima. Ako se želi postići viši dekstrozni ekvivalent, potreban je drugi reaktor povezati na ekstruder da bi se produžilo vreme hidrolize (Meagher i Grafelman, 1999). Primena odvojenih koraka procesa za želatinizaciju i enzimsku hidrolizu može biti korisna zato što to omogućava nezavisnu optimizaciju ovih procesa. S druge strane, to takođe može dovesti do većih troškova opreme.

Problematiku inhibicije enzima amilaze supstratom (skrobom) i proizvodom (glukozom) takođe su proučavale Kolusheva i Marinova (2007). Ove naučnice su ispitujući uticaj početne koncentracije supstrata na tok reakcije hidrolize skroba termostabilnom α -amilazom primetile da je za početne koncentracije skroba od 250 i 300 g l⁻¹ stepen hidrolize nakon 30 minuta skoro identičan (30,1% i 30,3%). Pretpostavile su da je to posledica inhibitornog dejstva redukujućih šećera nastalih tokom hidrolize. Pretpostavku su potvrdile dodavanjem glukoze na samom početku procesa hidrolize i zaključile da se brzina reakcije hidrolize smanjuje proporcionalno dodatnoj količini glukoze. Yankov i saradnici (1986) takođe su došli do zaključka da dodatno povećanje koncentracije glukoze utiče na smanjenje brzine hidrolize skroba.

Iz podataka prikazanih u tabeli 6.6. i na slici 6.1. može se zaključiti da se najviše vrednosti koncentracije i prinosa glukoze postižu pri hidromodulu 1:3, koji je usvojen kao optimalan. Ovi rezultati su u skladu sa zaključcima istraživanja sprovedenih na TMF-u (Nikolić, 2009).

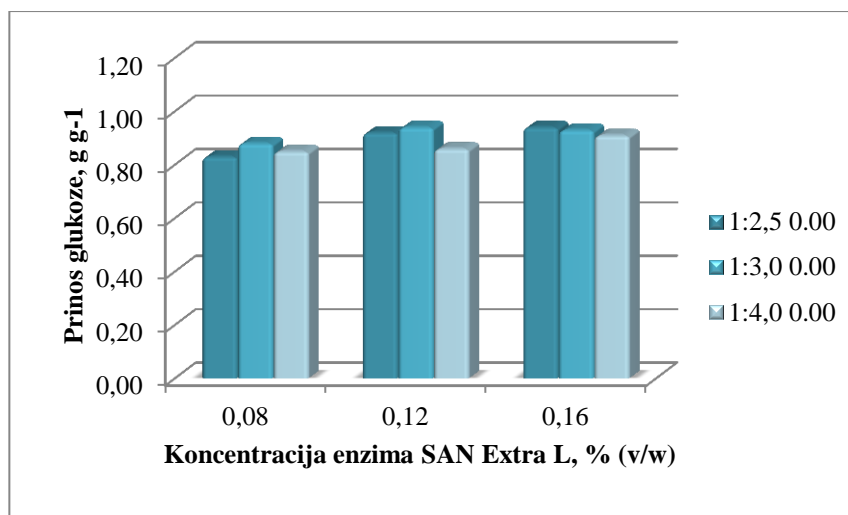
6.2.1.2. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri konstantnoj koncentraciji enzima Termamyl SC i različitim hidromodulima

Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa nastale glukoze nakon završene dvojno-enzimske hidrolize (utečnjavanja i ošećerenja) skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633 ispitivan je pri hidromodulima: 1:2,5, 1:3 i 1:4 kao i konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC (0,02% (v/w)). Rezultati ovih eksperimenata prikazani su u tabeli 6.7.

Tabela 6.7. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije i prinosa glukoze skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633 pri različitim hidromodulima

Koncentracija enzima SAN Extra L, %(v/w)	Koncentracija glukoze, g l ⁻¹			Prinos glukoze, g g ⁻¹		
	1:2,5	1:3	1:4	1:2,5	1:3	1:4
0,08	175,14	161,46	125,20	0,83	0,88	0,85
0,12	193,47	173,50	125,83	0,92	0,94	0,86
0,16	197,18	170,46	133,35	0,94	0,93	0,91

Uslovi procesa su kao na slici 6.2.



Slika 6.2. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu prinosa glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri hidromodulima 1:2,5, 1:3 i 1:4 i konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC. Uslovi procesa: 1) utečnjavanje: $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6$, $\tau=1\text{h}$, $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$ (v/w); 2) ošecerenje: $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=4\text{h}$, brzina mešanja $v=150\text{ obrt min}^{-1}$ (-0,08%, - 0,12%, - 0,16% (v/w) SAN Extra L)

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.7. se može zaključiti da se najviše koncentracije i prinosi glukoze nakon faze ošecerenja skroba postižu pri hidromodulu 1:3, a najniže koncentracije glukoze pri hidromodulu 1:2,5. Iako je pri hidromodulu 1:2,5 početna koncentracija supstrata najviša, veliki viskozitet suspenzije kao i značajni otpori mešanju usled nastajanja grudvica i inhibicija enzima supstratom i proizvodom (glukoza), ostvareni rezultati prinosa i koncentracije glukoze su niži od očekivanih. Hidromodul 1:4 omogućio je smanjenje viskoziteta suspenzije, a samim tim i lakše mešanje kao i sprečavanje inhibicije enzima supstratom. Pokazalo se da je nedostatak ovog hidromodula niska početna koncentracija supstrata kojom se postižu niže koncentracije i prinos glukoze nego pri hidromodulu 1:3.

Prema istraživanjima Van der Veena i saradnika (2006) povećanje početne koncentracije supstrata u procesima hidrolize i fermentacije može imati više prednosti kao što su: smanjenje potrošnje energije, upotreba manje količine vode, smanjenje zapremine reaktora i povećanje zapreminske produktivnosti za 17%. Neki istraživači, međutim, smatraju da je hidroliza skroba efikasnija pri nižim koncentracijama skroba (enzimi potpunije razgrađuju skrob u rastvorima sa manjom koncentracijom) i sprečava se mogućnost pojave inhibicije enzima supstratom (Lazić i sar., 2004). Lazić i saradnici su utvrdili da ukoliko se hidromodul poveća sa 1:1,05 na samo 1:1 prilikom hidrolize skroba iz krompira, maksimalni dekstrozni ekvivalent poraste sa 40,9% na 51,2%.

Lemuz i saradnici (2009) su došli do zaključka da se pri početnim koncentracijama suve materije između 35 i 40% ostvaruju niži prinosi etanola što su pripisali lošijem mešanju u toku fermentacije, zbog toga su u svom radu odabrali 25% (hidromodul 1:2,5) suve materije kao optimalnu početnu koncentraciju. Koncentracija suve materije od 30% omogućava visoke prinose etanola i najčešće se primenjuje u industriji (tipično 30-32%) (Kelsall i Lyons, 2003). Arasaratnam i saradnici (1993) su objavili rezultate ispitivanja hidrolize skroba brašna prema kojima je sa većom početnom koncentracijom skroba ostvarena slabija hidroliza. Na primer, hidrolizom 16% suspenzije kukuruznog brašna postigli su prinos glukoze od 76%, a hidrolizom 40% suspenzije ostvaren je prinos od samo 50,2% glukoze. Glavni nedostatak hidrolize skroba u uslovima visoke koncentracije suve materije jeste formiranje sporednih proizvoda kao što su izomaltoza i izomaltotrioza koje mogu činiti i do 8% suve materije (Van der Veen i sar., 2006). Koncentrovanije suspenzije kukuruznog brašna pokazuju i lošije filtracione karakteristike, a usled povećanog viskoziteta javljaju se i problemi sa mešanjem (Nikolić, 2009).

Na osnovu ostvarenih koncentracija i prinosa glukoze nakon hidrolize brašna celog zrna kukuruza pri ispitivanim hidromodulima (tabela 6.7, slika 6.2) kao i izloženih ekonomskih razmatranja, usvojen je hidromodul 1:3 kao optimalan.

6.2.1.3. Parametri za proračun prinosa bioetanola

S obzirom da je proizvodnja bioetanola iz kukuruznog zrna zasnovana na iskorišćenju glukoze nastale hidrolizom skroba, koncentracije ovih ugljenih hidrata u fermentacionoj smeši predstavljaju parametre neophodne za proračun prinosa ovog alkohola. U tabeli 6.8. su prikazani parametri za proračun prinosa etanola iz pojedinih hibrida kukuruza: sadržaj skroba u znu, početna koncentracija skroba u suspenziji, teorijska koncentracija glukoze i teorijska koncentracija etanola, dobijeni primenom jednačina 11, 15 i 19 (poglavlje 5.2).

Tabela 6.8. Sadržaj skroba u zrnu, početna koncentracija skroba u suspenziji pre hidrolize (hidromodul 1:3), teorijska koncentracija glukoze i teorijska koncentracija etanola za pojedine hibride kukuruza

Genotip	Sadržaj skroba u zrnu, C_s , %	Početna konc. skroba u suspenziji c_s , g l ⁻¹	Teorijska konc. glukoze $c_{glu, teor}$, g l ⁻¹	Teorijska konc. etanola $c_{et, teor}$, %
ZP 172/8	72,85	182,13	202,35	10,32
ZP 243	73,50	183,75	204,15	10,41
ZP 341	70,40	176,00	195,54	9,97
ZP 362	74,61	186,53	207,23	10,57
ZP 377	72,57	181,43	201,57	10,28
ZP 434	72,04	180,10	200,09	10,20
ZP 444	72,25	180,63	200,68	10,23
ZP 484	69,60	174,00	193,31	9,86
ZP 505	73,38	183,45	203,81	10,40
ZP 548	72,04	180,10	200,09	10,20
ZP 560	72,39	180,98	201,07	10,25
ZP 574/8	72,07	180,18	200,18	10,21
ZP 600	74,42	186,05	206,70	10,54
ZP 606	73,16	182,90	203,20	10,36
ZP 611k	68,57	171,43	190,46	9,71
ZP 620b	73,31	183,28	203,62	10,38
ZP 633	73,55	183,88	204,29	10,42
ZP 666	74,26	185,65	206,26	10,52
ZP 677	74,67	186,68	207,40	10,58
ZP 704wx	74,13	185,33	205,90	10,50
ZP 74b	74,94	187,35	208,14	10,62
ZP 747	74,08	185,20	205,76	10,49
ZP 749	73,46	183,65	204,04	10,41
ZP 789	73,66	184,15	204,59	10,43
ZP 808	74,55	186,38	207,07	10,56
ZP 877	74,68	186,70	207,42	10,58
ZP Rumenka	65,38	163,45	181,59	9,26
Minimum	65,38	163,45	181,59	9,26
Maksimum	74,94	187,35	208,14	10,62
SD	2,15	5,37	5,97	0,30
Prosek	72,76	181,90	202,09	10,30

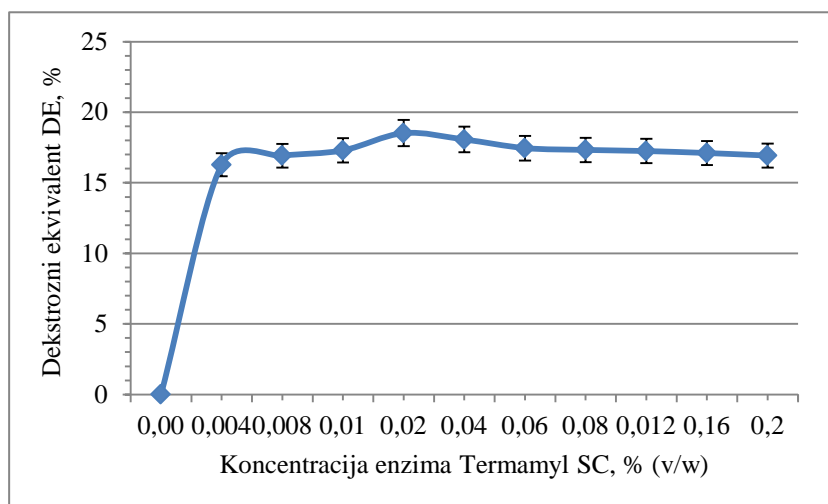
6.2.1.4. Određivanje optimalne koncentracije enzima Termamyl SC u fazi utečnjavanja skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri hidromodulu 1:3

Pri hidromodulu 1:3, koji je prethodno usvojen kao optimalan, vršena je dvojni-enzimska hidroliza primenom različitih koncentracija enzima Termamyl SC i konstantne koncentracije enzima SAN Extra L (0,10% (v/w)) kako bi se odredila optimalna koncentracija enzima Termamyl SC. Optimalna koncentracija enzima Termamyl SC omogućava odgovarajući stepen utečnjavanja odnosno likvefakcije skroba brašna celog zrna kukuruza koji je neophodan da bi se postiglo što bolje ošećerenje u narednoj fazi hidrolize – saharifikaciji. Po završetku dvostepene enzimske hidrolize određivani su parametri: koncentracija nastale glukoze, dekstrozni ekvivalent, prinos glukoze i procenat od teorijske koncentracije glukoze. U tabeli 6.9. i na slici 6.3. su prikazani rezultati ovog eksperimenta.

Tabela 6.9. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu koncentracije glukoze, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze nakon dvojni-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri konstantnim vrednostima koncentracije enzima SAN Extra L i hidromodula

Koncentracija enzima Termamyl SC, %(v/w)	Koncentracija glukoze, g l⁻¹	Dekstrozni ekvivalent DE, %	Prinos glukoze, g g⁻¹	Procenat od teorijske koncentracije glukoze, %
0,004	143,94	16,28	0,78	70,46
0,008	149,67	16,92	0,81	73,26
0,010	152,99	17,30	0,83	74,89
0,020	163,75	18,52	0,89	80,16
0,040	159,83	18,07	0,87	78,24
0,060	154,41	17,46	0,84	75,58
0,080	153,22	17,33	0,83	75,00
0,12	152,56	17,25	0,83	74,68
0,16	151,33	17,11	0,82	74,08
0,20	149,72	16,93	0,81	73,29

Uslovi procesa su kao i na slici 6.3.



Slika 6.3. Uticaj koncentracije enzima Termamyl SC na promenu dekstroznog ekvivalenta nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri konstantnim vrednostima koncentracije enzima SAN Extra L i hidromodula. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, brzina mešanja $v=150$ obrt min^{-1} ; utečnjavanje: $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6$, $\tau=1\text{h}$; ošećerenje: $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=4\text{h}$, $c(\text{SAN Extra L}) = 0,10\%$ (v/w)

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.9. i na slici 6.3. se uočava da pri koncentraciji 0,02% (v/w) enzima Termamyl SC dolazi do povećanja svih prikazanih procesnih parametara nakon završene dvojno-enzimske hidrolize, a postižu se i njihove maksimalne vrednosti. Pored toga može se zaključiti da se primenom koncentracija enzima između 0,02 i 0,08% enzima Termamyl SC ostvaruju približne vrednosti ispitivanih parametara, kao i da dalje povećanje koncentracije enzima dovodi do blagog pada vrednosti ovih parametara nakon završene dvojno-enzimske hidrolize.

Do sličnih zapažanja su došli i Apar i Özbek (2004) prilikom izvođenja likvefakcije kukuruznog skroba α -amilazom iz *Bacillus* sp. Ispitujući uticaj koncentracije amilaze na stepen hidrolize, utvrdili su da se najveća brzina hidrolize postiže pri koncentraciji amilaze od $1,6 \text{ g l}^{-1}$. Takođe, utvrdili su da primenom koncentracija enzima u opsegu $1,6-2,0 \text{ g l}^{-1}$ ne dolazi do promene u brzini hidrolize, što objašnjavaju zasićenjem skrobnih granula aktivnim molekulima enzima. Pored navedena dva istraživača, Textor i saradnici (1998) ovu pojavu objašnjavaju jednom vrstom takozvane enzim-enzim inhibicije koja dovodi do smanjene mogućnosti aktivnih centara enzima da se efikasno vežu za čestice skroba.

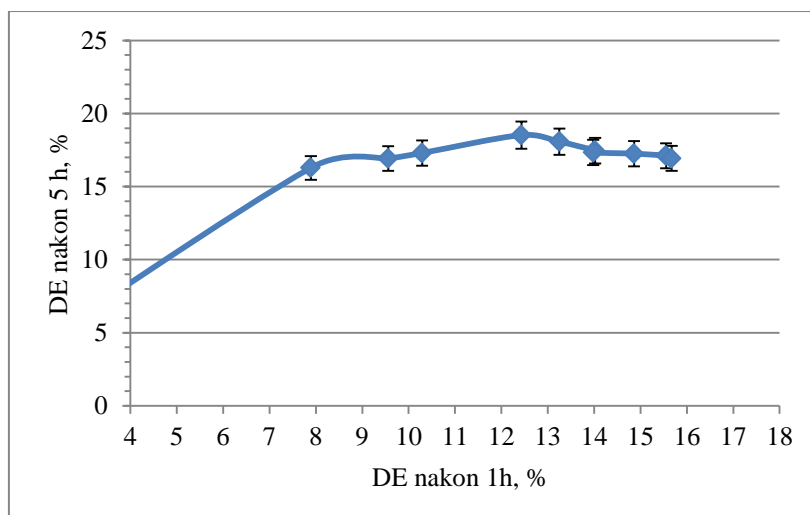
Budući da je ispitivana hidroliza skroba dvostepeni proces, kako bi se odredila optimalna koncentracija enzima Termamyl SC, potrebno je da se ispita kako dekstrozni ekvivalent postignut nakon faze likvefakcije (1h hidrolize) utiče na dekstrozni

ekvivalent nakon završene obe faze hidrolize (5h hidrolize) skroba brašna celog zrna kukuruza. Rezultati su prikazani u tabeli 6.10. i na slici 6.4.

Tabela 6.10. Uticaj dekstroznog ekvivalenta hidrolizata iz faze utečnjavanja na dekstrozni ekvivalent hidrolizata nakon faze ošećerenja pri konstantnim vrednostima koncentracije enzima SAN Extra L i hidromodulu, pri različitim koncentracijama enzima Termamyl SC

Koncentracija enzima Termamyl SC, %(v/w)	Dekstrozni ekvivalent DE (1h), %	Dekstrozni ekvivalent DE (5h), %
0,004	7,89	16,28
0,008	9,56	16,92
0,010	10,29	17,3
0,020	12,43	18,52
0,040	13,25	18,07
0,060	14,02	17,46
0,080	13,98	17,33
0,12	14,86	17,25
0,16	15,55	17,11
0,20	15,67	16,93

Uslovi procesa su kao na slici 6.3.



Slika 6.4. Uticaj dekstroznog ekvivalenta hidrolizata iz faze utečnjavanja na dekstrozni ekvivalent hidrolizata nakon faze ošećerenja pri konstantnom hidromodulu i koncentraciji enzima SAN Extra L i različitim koncentracijama enzima Termamyl SC

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.10. i na slici 6.4. može se zaključiti da se maksimalna vrednost dekstroznog ekvivalenta od 18,52% nakon završene dvojni-enzimske hidrolize postiže primenom enzima Termamyl SC u koncentraciji od 0,02%

(v/w) u fazi utečnjavanja skroba. Takođe se može primetiti da se povećanjem dekstroznog ekvivalenta u fazi utečnjavanja iznad DE~13 dolazi do pada vrednosti deskstroznog ekvivalenta nakon faze ošećerenja. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja koja su sprovedena na Tehnološko-metalurškom fakultetu prethodnih godina na komercijalnom kukuruznom brašnu (Nikolić, 2009). Bebić i saradnici (2000) su postigli slične rezultate u eksperimentima hidrolize kukuruznog skroba pomoću enzima Termamyl 120L i AMG 150L. U zavisnosti od primenjenih procesnih uslova optimalne vrednosti DE nakon likvefakcije kretale su se između 15 i 18. I drugi istraživači smatraju da optimalne vrednosti DE nakon likvefakcije treba da se kreću od 10-20 (Aiyer, 2005).

Prema ostvarenim rezultatima prikazanim u tabelama 6.9. i 6.10. i na slikama 6.3. i 6.4, može se usvojiti koncentracija enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) kao optimalna za fazu utečnjavanja skroba kako bi se postigli najbolji efekti u narednoj fazi hidrolize – saharifikaciji.

U literaturi se takođe može naići na podatak da je u eksperimentima korišćena upravo ova koncentracija enzima Termamyl u fazi likvefakcije. Tako su Montesinos i Navaro (2000) u cilju proizvodnje etanola iz pšeničnog brašna izvodili hidrolizu koristeći 0,02% (v/w skroba) enzima Termamyl 120L, dok su Xu i saradnici u fazi utečnjavanja skroba kukuruznog brašna koristili koncentraciju α -amilaze od 0,05% (v/w brašna). Treba napomenuti da amilaza Termamyl 120L ima znatno nižu aktivnost od Termamyla SC korišćenog u našim eksperimentima. Tokom određivanja optimalne koncentracije enzima za određeni proces, neophodno je imati u vidu cenu enzima koja predstavlja značajan deo ukupnih troškova procesa.

6.2.1.5. Određivanje optimalne koncentracije enzima SAN Extra L u fazi ošećerenja skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri hidromodulu 1:3

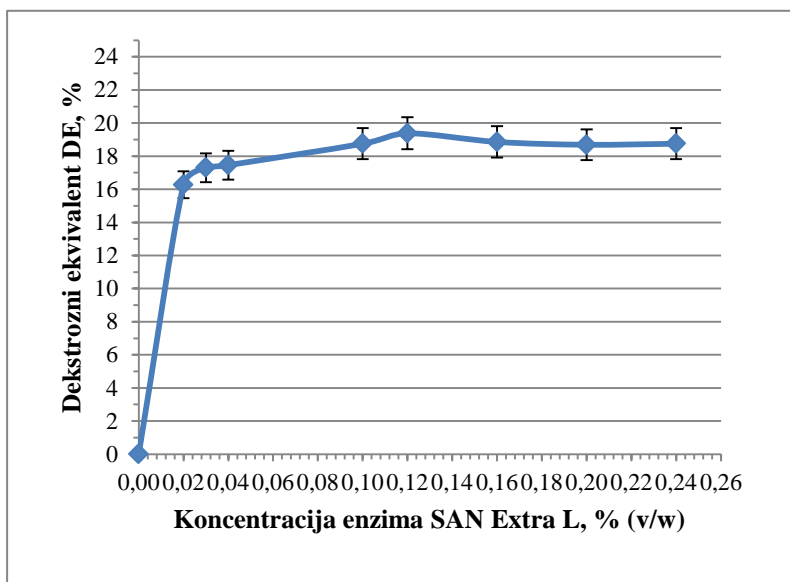
Rezultati eksperimenata vršenih u cilju određivanja optimalne koncentracije enzima SAN Extra L u fazi ošećerenja skroba brašna celog zrna kukuruza prikazani su u ovom odeljku. Kako bi se odredila optimalna količina ovog enzima njegova koncentracija je varirana, pri konstantnoj ranije usvojenoj optimalnoj koncentraciji enzima Termamyl SC od 0,02% (v/w) i hidromodulu 1:3. Nakon završene dvojni-enzimske hidrolize određivani su sledeći parametri: koncentracija nastale glukoze,

dekstrozni ekvivalent, prinos glukoze i procenat od teorijske koncentracije glukoze. Rezultati su prikazani u tabeli 6.11. i na slici 6.5.

Tabela 6.11. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu koncentracije glukoze, dekstroznog ekvivalenta prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633 pri konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC i hidromodula

Koncentracija enzima SAN Extra L, % (v/w)	Koncentracija glukoze, g l ⁻¹	Dekstrozni ekvivalent DE, %	Prinos glukoze, g g ⁻¹	Procenat od teorijske koncentracije glukoze, %
0,020	143,94	16,27	0,78	70,46
0,030	152,99	17,30	0,83	74,89
0,04	154,41	17,46	0,84	75,58
0,10	163,75	18,75	0,89	80,16
0,12	171,35	19,38	0,93	83,88
0,16	166,76	18,86	0,91	81,63
0,20	165,32	18,69	0,90	80,92
0,24	165,83	18,75	0,90	81,17

Uslovi procesa su kao na slici 6.5.



Slika 6.5. Uticaj koncentracije enzima SAN Extra L na promenu dekstroznog ekvivalenta nakon dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri konstantnoj vrednosti koncentracije enzima Termamyl SC. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, brzina mešanja $v=150$ obrt min⁻¹; utečnjavanje: $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6$, $\tau=1\text{h}$, $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$ (v/w); ošecerenje: $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=4\text{h}$

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 6.11. i na slici 6.5, najviše vrednosti procesnih parametara nakon dvojno-enzimske hidrolize se postižu pri koncentraciji enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w). Pri ovoj koncentraciji enzima koncentracija glukoze iznosi $171,35 \text{ g l}^{-1}$, dekstrozni ekvivalent 19,38%, prinos glukoze $0,93 \text{ g g}^{-1}$ i procenat od teorijske koncentracije glukoze 83,88%. Daljim povećanjem koncentracije ovog enzima dolazi do pada vrednosti ostalih prikazanih parametara. Zbog toga je usvojena koncentracija enzima SAN Extra L od 0,12% (v/w) kao optimalna za fazu saharifikacije skroba kukuruznog brašna pri hidromodulu 1:3. Ovim vrednostima se potvrđuju rezultati ranijih istraživanja sprovedenih na TMF-u (Nikolić, 2009). U industriji se najčešće koristi koncentracija glukoamilaze od $0,8 \text{ l t}^{-1}$ (0,8% (v/w)) (Graves i sar., 2007). Lemuz i saradnici (2009) su se u svojim eksperimentima takođe odlučili za ovu koncentraciju enzima glukoamilaze, nakon što su ispitivali vrednosti koncentracije od 0,4 i 0,16% (v/w). Xu i saradnici (2005) su objavili nešto višu optimalnu vrednost koncentracije glukoamilaze koja je iznosila 0,15% (v/w).

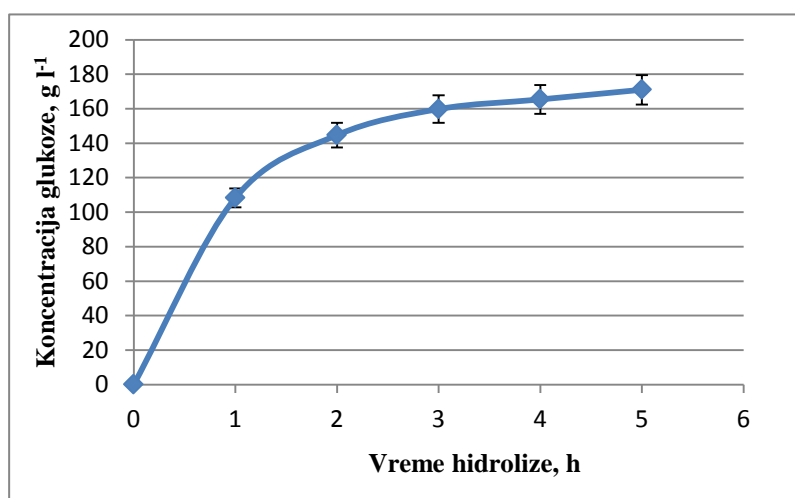
Primenom optimalnih koncentracija enzima postižu se visoke vrednosti prinosa glukoze odnosno konverzije skroba nakon završene hidrolize. Nešto niže prinose glukoze od $0,76 \text{ g g}^{-1}$ postigli su Arasaratnam i saradnici (1993) primenom sličnih koncentracija amilaze i glukoamilaze. Niži prinosi se mogu objasniti razlikama u hemijskom sastavu sirovine i početnoj koncentraciji supstrata. Veoma visoke vrednosti konverzije kukuruznog skroba od preko 96% postigli su Karakastanis i Liakopoulou-Kyriakides (1998) nakon 24h simultanog dejstva amilaze i glukoamilaze.

6.2.1.6. Kinetika dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza

Analizom dobijenih rezultata usvojeni su optimalni parametri za dvojno-enzimsku hidrolizu skroba brašna celog zrna kukuruza: hidromodul 1:3, koncentracija enzima Termamyl SC 0,02% (v/w) i koncentracija enzima SAN Extra L 0,12% (v/w). Usvojeni parametri su korišćeni u svim narednim eksperimentima tokom ispitivanja alkoholne fermentacije.

Tabela 6.12. Promena koncentracije glukoze, dekstroznog ekvivalenta, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze tokom dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633

Vreme, h	Koncentracija glukoze, g l ⁻¹	Dekstrozni ekvivalent DE, %	Prinos glukoze, g g ⁻¹	Procentat od teor. konc. glukoze, %
1	108,31	12,25	0,59	53,02
2	144,70	16,36	0,79	70,83
3	159,82	18,07	0,87	78,23
4	165,41	18,70	0,90	80,97
5	171,04	19,34	0,93	83,72

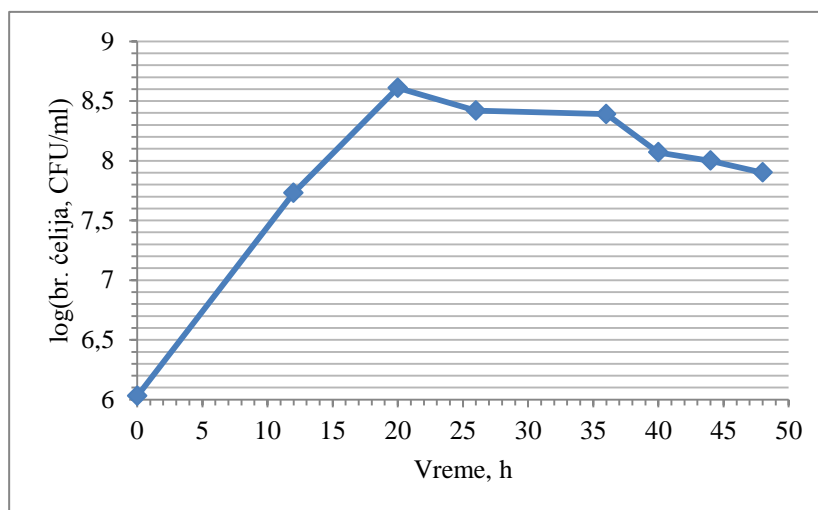


Slika 6.6. Tok dvojno-enzimske hidrolize skroba iz brašna celog zrna kukuruza pri optimalnim vrednostima procesnih parametara. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, brzina mešanja $v=150 \text{ obrt min}^{-1}$, utečnjavanje – $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6$, $\tau=1\text{h}$, $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$ (v/w); ošecerenje – $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=4\text{h}$, $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$ (v/w)

Iz podataka prikazanih u tabeli 6.12. i na slici 6.6. može se uočiti porast koncentracije glukoze nastale hidrolizom skroba iz brašna celog zrna kukuruza u toku vremena. Takođe se uočava da dolazi do porasta i ostalih parametara: dekstroznog ekvivalenta, prinosa glukoze i procenta od teorijske koncentracije glukoze.

6.2.2. Alkoholna fermentacija hidrolizata skroba iz brašna celog zrna kukuruza

U eksperimentima alkoholnih fermentacija hidrolizata skroba iz brašna celog zrna ispitivanih ZP hibrida kukuruza korišćen je kao proizvodni mikroorganizam kvasac *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* koji je pokazao najbolje fermentativne karakteristike u prethodnim istraživanjima sprovedenim na Tehnološko-metalurškom fakultetu (Nikolić, 2009). Na osnovu istih istraživanja koja su potvrđena i na ZP hibridima, usvojena je i optimalna koncentracija inokuluma proizvodnog mikroorganizma od 2% (v/v) kojoj odgovara početan broj ćelija $\sim 2 \cdot 10^5$ CFU ml⁻¹. Takođe je usvojena i temperatura odvijanja fermentacije od 30°C kao optimalna. Na slici 6.7. prikazana je kinetika rasta proizvodnog kvasca u toku procesa fermentacije.



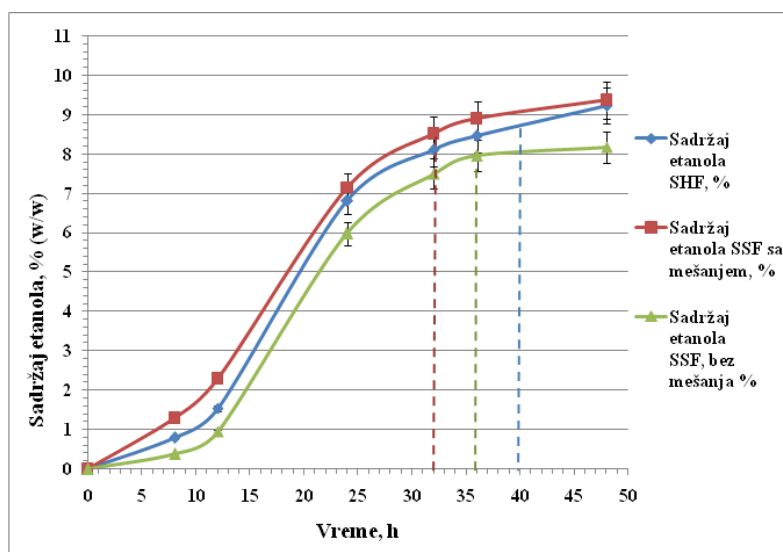
Slika 6.7. Kinetika rasta kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* u toku fermentacije hidrolizata skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, utečnjavanje: $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6$, $\tau=1\text{h}$, $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$ (v/w), brzina mešanja $v=150$ obrt min^{-1} ; ošećerenje: $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=4\text{h}$, $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$ (v/w), fermentacija: $t=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=48\text{h}$, količina inokuluma 2% (v/v), brzina mešanja $v=120$ obrt min^{-1}

Sa slike se 6.7. može videti da se kvasac *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* u toku prvih 20 časova nalazi u fazi logaritamskog rasta, nakon čega sledi stacionarna faza koja traje do oko 36h fermentacije, kada počinje faza umiranja ćelija koja je uslovljena iscrpljivanjem šećera iz podloge i eventualno inhibicijom visokom koncentracijom etanola.

6.2.2.1. Kinetika procesa odvojene hidrolize i fermentacije i simultane hidrolize i fermentacije pod različitim uslovima procesa

U ovoj grupi eksperimenata upoređivana je kinetika proizvodnje bioetanola u procesima odvojene hidrolize i fermentacije (SHF) i simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) na brašnu celog zrna hibrida kukuruza ZP 633. U cilju određivanja parametara što ekonomičnijeg postupka proizvodnje, upoređeni su procesi SSF sa i bez automatskog mešanja tokom saharifikacije i fermentacije.

Na slici 6.8. je prikazana kinetika ovih procesa.



Slika 6.8. Kinetika proizvodnje bioetanola tokom SHF i SSF (sa i bez mešanja) procesa iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 633. Uslovi procesa: hidromodul 1:3, utečnjavanje: $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6$, $\tau=1\text{h}$, $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$ (v/w), brzina mešanja $v=150\text{ obrt min}^{-1}$; *SHF proces*: ošecerenje: $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=4\text{h}$, $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$ (v/w), fermentacija: $t=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, količina inokuluma 2% (v/v), brzina mešanja $v=120\text{ obrt min}^{-1}$; *SSF proces*: $t=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $c(\text{SAN Extra L})=0,12\%$ (v/w), količina inokuluma 2% (v/v), brzina mešanja $v=100\text{ obrt min}^{-1}$

Na dijagramu prikazanom na slici 6.8. isprekidane vertikalne linije predstavljaju optimalna vremena završetka procesa fermentacije. Najznačajniji parametri proizvodnje bioetanola u ovim tačkama procesa prikazani su u tabeli 6.13.

Tabela 6.13. Vrednosti značajnih procesnih parametara postignutih tokom SHF i SSF (sa i bez mešanja) procesa na brašnu celog zrna hibrida kukuruza ZP 633 pri optimalnom vremenu trajanja procesa

Parametar	Proces		
	SHF	SSF sa mešanjem	SSF bez mešanja
Optimalno vreme trajanja procesa, h	40	32	36
Sadržaj bioetanola, % (w/w)	8,78	8,52	7,95
Prinos bioetanola $Y_{P/S}$, g g ⁻¹	0,48	0,46	0,43
Procenat od teorijskog sadržaja bioetanola, %	84,26	81,76	76,30
Volumetrijska produktivnost P, g l ⁻¹ h ⁻¹	2,20	2,66	2,21

Sa slike 6.8. i iz tabele 6.13. može se zaključiti da se najveći prinosi bioetanola u toku vremena ostvaruju postupkom SSF sa mešanjem, a neznatno manje vrednosti postupkom SHF, dok se najniže vrednosti procesom SSF bez mešanja. U optimalnom vremenu se procesom SHF postiže viši prinos bioetanola, međutim, procesom simultane hidrolize i fermentacije postiže se početno skraćjenje procesa za 4 sata koliko traje saharifikacija u SHF procesu. Takođe treba imati u vidu i da se proces simultane hidrolize i fermentacije odvija na temperaturi od 30°C što je znatno niža temperatura od one neophodne za saharifikaciju (55°C), te se na taj način postiže značajna ušteda energije i povećava efikasnost proizvodnje etanola. Tako bi optimalan proces SHF uključujući hidrolizu trajao 45h, SSF sa mešanjem uključujući likvefakciju 33h, a bez mešanja 37h.

Wang i saradnici (2005) su ispitivali konvencionalni postupak hidrolize i proces fermentacije kukuruznog brašna u trajanju od 72h i pri tom došli do zaključka da se nakon 30-36h fermentacije glukoza u potpunosti iscrpi. Ovaj podatak ukazuje na to da je skraćjenje postupka sasvim opravdano jer nakon 36h fermentacije ne preostaje više glukoze ili je rezidualna koncentracija ovog šećera koji bi kvasac preveo u etanol u procesu fermentacije zanemarljivo mala.

6.2.2.2 Proizvodnja bioetanola postupkom odvojene hidrolize i fermentacije (SHF) skroba iz brašna celog zrna odabranih hibrida kukuruza

U ovim eksperimentima vršena je odvojena hidroliza i fermentacija skroba na uzorcima brašna celog zrna odabranih ZP hibrida kukuruza (ZP 434, ZP 633, ZP 611k, ZP 74b, ZP 704wx i ZP Rumenka). Brašno celog zrna kukuruza (100 g) pomešano je u odnosu 1:3 sa vodom. Dodato je 60 ppm Ca^{2+} (u obliku CaCl_2). Smeša je tretirana enzimima u dvostepenom postupku. Prvi korak, likvefakcija, odvijala se na temperaturi od 85°C i pH 6,0 pri koncentraciji enzima Termamyl SC od 0,02% v/w, a drugi korak, saharifikacija odvijala se na temperaturi od 55°C i pH 5,0 pri koncentraciji enzima SAN Extra L od 0,12% v/w. Likvefakcija je trajala 1h, a saharifikacija 4h. Hidroliza je vršena u erlenmajerima u vodenom kupatilu sa termostatom i mešanjem (brzina mešanja $v = 150 \text{ obrt min}^{-1}$).

Hidrolizati skroba dobijeni dvostepenim postupkom hidrolize brašna celog zrna kukuruza podvrgnuti su procesu fermentacije pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u semi-anaerobnim uslovima (pH 5,0; $t = 30^\circ\text{C}$; brzina mešanja: 120 obrt min^{-1}). Pretpostavljeno je da je pasterizacija supstrata postignuta u toku enzimske likvefakcije ($t = 85^\circ\text{C}$, $\tau = 1\text{h}$) bila dovoljna te da nije bila potrebno vršiti dodatnu sterilizaciju pre fermentacije. Smeše hidrolizata koje su sadržale između 170,46 i 188,67 g kg^{-1} početne koncentracije glukoze u zavisnosti od hibrida fermentisane su pod uticajem kvasca u periodu od 48h u erlenmajerima u vodenom kupatilu sa termostatom i mešanjem. Koncentracija inokuluma korišćena u eksperimentima za fermentaciju hidrolizata brašna celog zrna kukuruza iznosila je 2% w/w. U toku fermentacije praćena je potrošnja šećera kao i sinteza bioetanola. Fermentacija svakog uzorka vršena je u tri ponavljanja.

Važniji parametri proizvodnje bioetanola određivani nakon 24 i 48h od početka fermentacije hidrolizata skroba iz brašna celog zrna kukuruza prikazani su u tabeli 6.14.

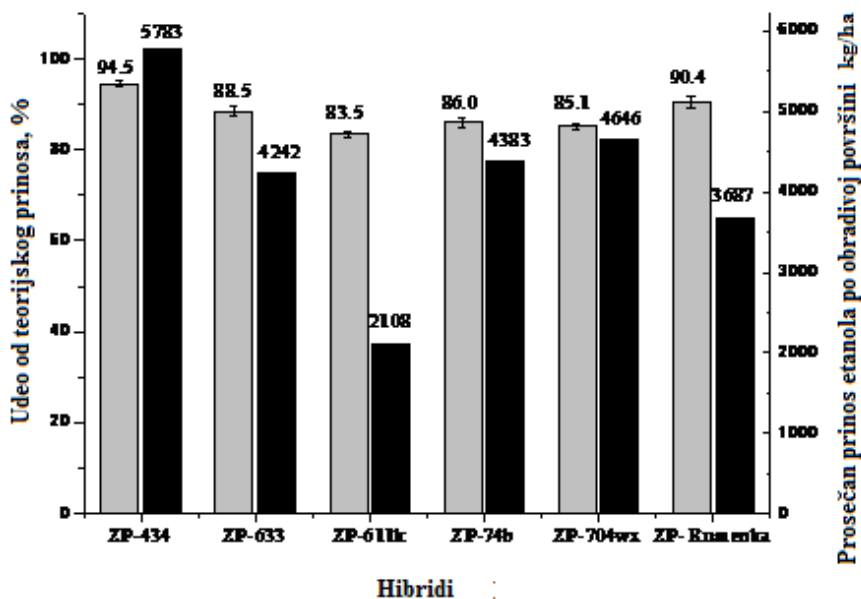
Tabela 6.14. Parametri proizvodnje bioetanola

Genotip	Vreme, h	Sadržaj etanola, %	Koncentracija glukoze, g l ⁻¹	Volumetrijska produktivnost P, g l ⁻¹ h ⁻¹	Prinos etanola Y _{P/S} , g etanola po g skroba
ZP 434	0	0,00	184,89	0,00	0,000
	24	6,51	31,75	2,71	0,362
	48	9,64	3,22	2,01	0,535
ZP 633	0	0,00	187,47	0,00	0,000
	24	6,80	32,52	2,83	0,370
	48	9,22	4,23	1,92	0,501
ZP 611k	0	0,00	177,93	0,00	0,000
	24	6,34	30,81	2,64	0,370
	48	8,11	4,17	1,69	0,473
ZP 74b	0	0,00	185,71	0,00	0,000
	24	5,84	30,73	2,43	0,312
	48	9,13	4,53	1,90	0,487
ZP 704wx	0	0,00	188,67	0,00	0,000
	24	6,94	36,13	2,89	0,375
	48	8,94	5,23	1,86	0,482
ZP Rumenka	0	0,00	170,46	0,00	0,000
	24	6,85	28,47	2,85	0,419
	48	8,38	3,76	1,74	0,512

Hibrid ZP 434 dao je najveći sadržaj bioetanola, volumetrijsku produktivnost i prinos bioetanola. Najniži prinos po gramu iskorišćenog skroba određen kod hibrida ZP 611k i ZP 704wx može se pripisati visokom sadržaju tvrde frakcije endosperma (tabela 6.2). Najniži sadržaj tvrde frakcije a samim tim i najviši sadržaj mekog endosperma određen je kod hibrida ZP 433. Kao što je i bilo očekivano, ovaj hibrid je pokazao najbolje fermentativne karakteristike (slika 6.9).

Statistički utvrđena korelacija između prinosa bioetanola nakon 48h fermentacije (tabela 6.14) i sadržaja mekog endosperma (tabela 6.2) hibrida ukazuje na to da sa statističke tačke gledišta postoji veoma značajna pozitivna korelacija između ova dva parametra ($r = 0,91$).

Efikasnost fermentacije ispitivanih hibrida predstavljena kao procenat od teorijskog sadržaja bioetanola nakon 48h fermentacije i prosečni prinosa bioetanola koji se može postići po jedinici obradive površine prikazani su na slici 6.9.



Slika 6.9. Procenat od teorijskog sadržaja nakon 48h fermentacije (sivi stubići) i prosečan prinos bioetanola po obradivoj površini (crni stubići) (Semenčenko i sar., 2013)

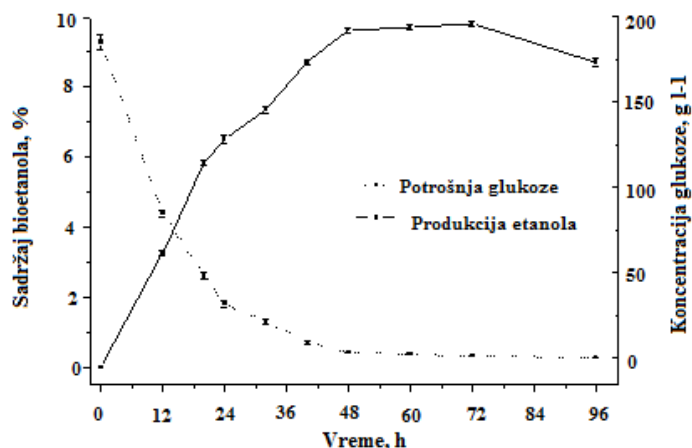
Prosečan prinos bioetanola po jedinici obradive površine pojedinih hibrida izračunat je na osnovu procenta od teorijskog prinosa bioetanola ostvarenog u toku fermentacije i prosečnog prinosa hibrida po hektaru obradive površine (podaci Instituta za kukuruz „Zemun Polje“). Najveća efikasnost fermentacije (94,5%) postignuta je na hidrolizatima skroba iz brašna celog zrna hibrida kukuruza ZP 434 koji je zuban žutog zrna.

Rezultati pojedinih ranije ispitivanih ZP hibrida pokazuju doslednost sa rezultatima ovog istraživanja; na primer, prinos bioetanola za hibrid ZP 434 nakon 34h fermentacije iznosio je 90,20% od teorijskog prinosa. Rezultati prinosa bioetanola na komercijalnom brašnu koje su objavili Nikolić i saradnici (2009) kretali su se u rasponu od 77,46 do 80,96% od teorijskog prinosa (u fermentacijama koje su trajale 38h i 72h). Bialas i saradnici (2010) objavili su prinos bioetanola od 83,38% od teorijske vrednosti na komercijalnom kukuruznom brašnu u procesu simultane saharifikacije i fermentacije ciklusa koji je trajao 72h. S obzirom da je skrob iz zrna kukuruza, koji se prvo hidrolizuje a zatim prevodi u bioetanol u procesu fermentacije, supstanca od suštinskog značaja u proizvodnji bioetanola, opravdano bi bilo očekivati da sadržaj skroba određuje prinos bioetanola. Izvestan broj istraživača (Dien i sar., 2002; Haeferle i sar., 2004; Singh i sar., 2005) objavili su rezultate ispitivanja uticaja odabira hibrida kukuruza u laboratorijskim postupcima (~ 300 ml zapremine) i zaključili da prinosi bioetanola nisu zavisili isključivo od sadržaja skroba.

Istraživanja mogućnosti proizvodnje bioetanola koja su sprovedi na pšenici Swanston i saradnici, (2007) i Awole i saradnici, (2012) takođe su dovela do zaključka da ne postoji direktna korelacija između prinosa bioetanola i koncentracije skroba u znu. Iz navedenog proizlazi da veza između prinosa bioetanola i koncentracije skroba nije sasvim pouzdana tako da koncentracija skroba ne može služiti kao pouzdan i jedini parametar kojim bi se mogao predvideti prinos bioetanola. U skladu sa tim, ovo istraživanje dovelo je do zaključka da sadržaj skroba u znu kukuruza nije jedini faktor koji utiče na prinos bioetanola. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da je koeficijent korelacije između sadržaja skroba i prinosa bioetanola nakon 48h iznosio $r=0,71$, odnosno da postoji veoma značajna pozitivna korelacija između ove dve promeljive. Međutim, iako je za najviši sadržaj skroba koji je imao hibrid ZP 74b (tabela 6.4) očekivan, najveći prinos bioetanola, to se nije ostvarilo. Moguće je da je maksimalan sadržaj celuloze i značajan udeo tvrdog endosperma (tabele 6.4. i 6.2) uticao na relativno nizak prinos bioetanola.

U našem istraživanju utvrđena je veoma značajna negativna korelacija između sadržaja proteina i prinosa bioetanola, gde je Pirsonov koeficijent korelacije iznosio $r = -0,84$ (tabela 6.4. i tabela 6.14).

Pored efikasnosti fermentacije, značajan faktor u ocenjivanju pogodnosti useva za proizvodnju bioetanola jeste i zahtev za površinom obradivog zemljišta, to jest prinos bioetanola koji se može dobiti po jedinici obradive površine. Kvalitet zemljišta je takođe veoma značajan faktor. Kao što je prikazano na slici 6.9. hibrid ZP 434 daje najveći prinos bioetanola po jedinici obradivog zemljišta ($5783,4 \text{ kg ha}^{-1}$), za njim sledi voštani hibrid ZP 704wx ($4646,5 \text{ kg ha}^{-1}$). Hibridi ZP 74b i ZP 633 mogu proizvoditi slične prinose bioetanola ($4383,9 \text{ kg ha}^{-1}$ i $4242,0 \text{ kg ha}^{-1}$), dok ZP Rumenka i ZP 611k mogu dati najmanje prinose računato na obradivu površinu ($3687,3 \text{ kg ha}^{-1}$ i $2108,0 \text{ kg ha}^{-1}$). Takođe je veoma važno napomenuti da je hibrid ZP 434 koji se pokazao kao najbolji za proizvodnju bioetanola, tolerantan na sušu, otporan na poleganje i daje dobre prinose i u skromnijim uslovima gajenja i na nadmorskoj visini do 600 metara. Kinetika proizvodnje bioetanola i potrošnje šećera najefikasnijeg hibrida ZP 434 ispitivana je u procesu fermentacije koji je trajao 96h, kao što je prikazano na slici 6.10.



Slika 6.10. Kinetika proizvodnje bioetanola i potrošnje glukoze najefikasnijeg hibrida ZP 434 tokom 96h fermentacije (Semenčenko i sar., 2013)

Maksimalan prinos bioetanola ostvaren je nakon 72 h fermentacije, posle čega je uočen neznatan pad prinosa. Međutim, usvojen je period fermentacije od 48h kao optimalan, uzimajući u obzir neznatne promene u porastu prinosa alkohola sa produženjem vremena fermentacije kao i uštede energije i vremena. Osim toga, produktivnost bioetanola u trenutku 48h bila je veća i iznosila je $2,01 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dok je za 72h iznosila $1,36 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

6.2.2.3 Proizvodnja bioetanola postupkom simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) skroba iz brašna celog zrna ispitivanih hibrida kukuruza

U ovim eksperimentima je ispitana mogućnost smanjenja ukupnih troškova i povećanja efikasnosti procesa proizvodnje bioetanola primenom postupka simultane saharifikacije i fermentacije (SSF proces).

Brašno celog zrna ispitivanih hibrida kukuruza (100 g) pomešano je u odnosu 1:3 sa vodom. Dodato je 60 ppm Ca^{2+} (u obliku CaCl_2). Prvi korak, likvefakcija, odvijala se na temperaturi od 85°C pH=6,0 pri koncentraciji enzima Termamyl SC od 0,02% v/w, u trajanju $\tau=1\text{h}$. Likvefakcija je vršena u erlenmajerima u vodenom kupatilu sa termostatom i mešanjem (brzina mešanja 150 obrt min^{-1}). Po završenoj likvefakciji, smeša je ohlađena na 30°C i pH podešena na 5,0. Potom je dodat enzim SAN Extra L u koncentraciji 0,12% v/w, a zatim i inokulum kvasca *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* u koncentraciji 2% v/v. Simultana saharifikacija i fermentacija vršene su u semi-anaerobnim uslovima (pH=5,0; $t=30^\circ\text{C}$) u vodenom kupatilu bez mešanja zbog manjeg utroška energije, a uzorci su u prva četiri sata procesa ručno mešani na svakih 30 minuta.

Pretpostavljeno je da je pasterizacija supstrata postignuta u toku enzimskog utečnjavanja skroba ($t=85^\circ\text{C}$, $\tau=1\text{h}$) bila dovoljna te nije bilo potrebno vršiti dodatnu sterilizaciju pre fermentacije. U toku fermentacije praćena je potrošnja šećera kao i sinteza bioetanola. Fermentacija svakog uzorka vršena je u tri ponavljanja. Prosečna potrošnja glukoze nakon 48h fermentacije iznosila je čak 99%, dok se nakon 24h fermentacije kretala između 80-85% u zavisnosti od hibrida. U tabelama 6.15. i 6.16. prikazani su rezultati prinosa i produktivnosti bioetanola ostvareni nakon 24 i 48 sati fermentacije.

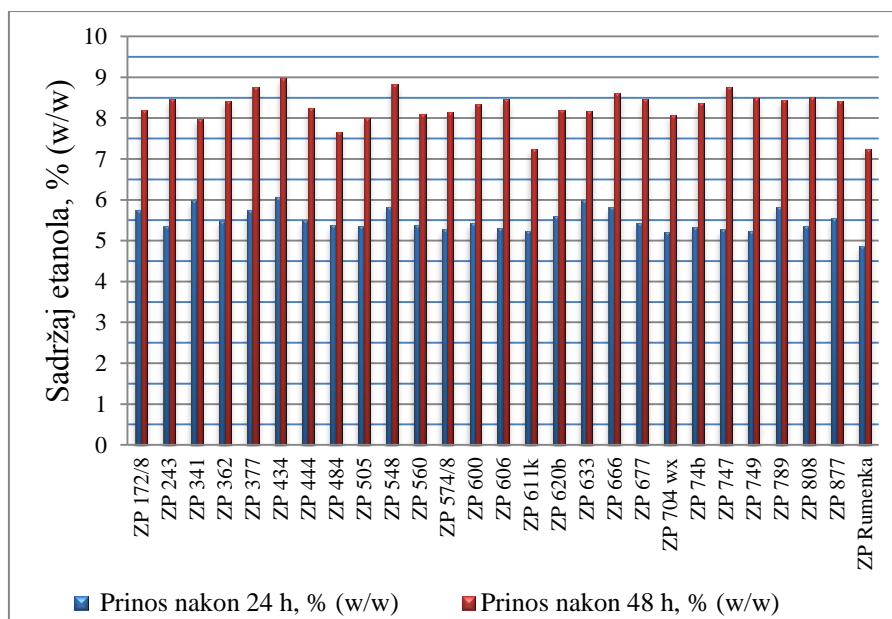
Tabela 6.15. Proces simultane saharifikacije i fermentacije (SSF), Uslovi procesa: utečnjavanje – hidromodul 1:3, $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=1\text{h}$ $c(\text{Termamyl SC})=0,02\%$ (v/w), brzina mešanja $v=150\text{ obrt min}^{-1}$; saharifikacija i fermentacija – $t=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $c(\text{SAN Extra L})=0,10\%$ (v/w), količina inokuluma 2% (v/v), $\tau=24\text{h}$

Genotip	Sadržaj etanola , % (w/w)	Procenat od teorijskog sadržaja etanola, %	Prinos etanola $Y_{P/S}$, g g^{-1}	Volumetrijska produktivnost, P $\text{g l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
ZP 172/8	5,75	55,72	0,316	2,40
ZP 243	5,36	51,49	0,292	2,23
ZP 341	5,99	60,08	0,340	2,50
ZP 362	5,48	51,84	0,294	2,28
ZP 377	5,74	55,84	0,316	2,39
ZP 434	6,07	59,51	0,337	2,53
ZP 444	5,49	53,67	0,304	2,29
ZP 484	5,37	54,46	0,309	2,24
ZP 505	5,36	51,54	0,292	2,23
ZP 548	5,82	57,06	0,323	2,42
ZP 560	5,37	52,39	0,297	2,24
ZP 574/8	5,28	51,71	0,293	2,20
ZP 600	5,42	51,42	0,291	2,26
ZP 606	5,30	51,16	0,290	2,21
ZP 611k	5,24	53,96	0,306	2,18
ZP 620b	5,60	53,95	0,305	2,33
ZP 633	5,98	57,39	0,325	2,50
ZP 666	5,81	55,23	0,313	2,50
ZP 677	5,43	51,32	0,291	2,26
ZP 704 wx	5,19	49,43	0,285	2,20
ZP 74b	5,33	50,19	0,284	2,20
ZP 747	5,27	50,23	0,284	2,20
ZP 749	5,24	50,34	0,295	2,20
ZP 789	5,81	55,70	0,316	2,42
ZP 808	5,34	50,57	0,286	2,23
ZP 877	5,55	52,46	0,298	2,31
ZP Rumenka	4,87	52,59	0,298	2,03
Minimum	4,87	49,43	0,284	2,03
Maksimum	6,07	60,08	0,34	2,53
Prosek	5,50	53,38	0,30	2,30

Tabela 6.16. Proces simultane saharifikacije i fermentacije (SSF), Uslovi procesa: utečnjavanje – hidromodul 1:3, $t=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\tau=1\text{h}$ $c(\text{Termamyl SC})= 0,02\%$ (v/w), brzina mešanja $v=150\text{ obrt min}^{-1}$; saharifikacija i fermentacija – $t=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $c(\text{SAN Extra L})= 0,10\%$ (v/w), količina inokuluma 2% (v/v), $\tau=48\text{h}$

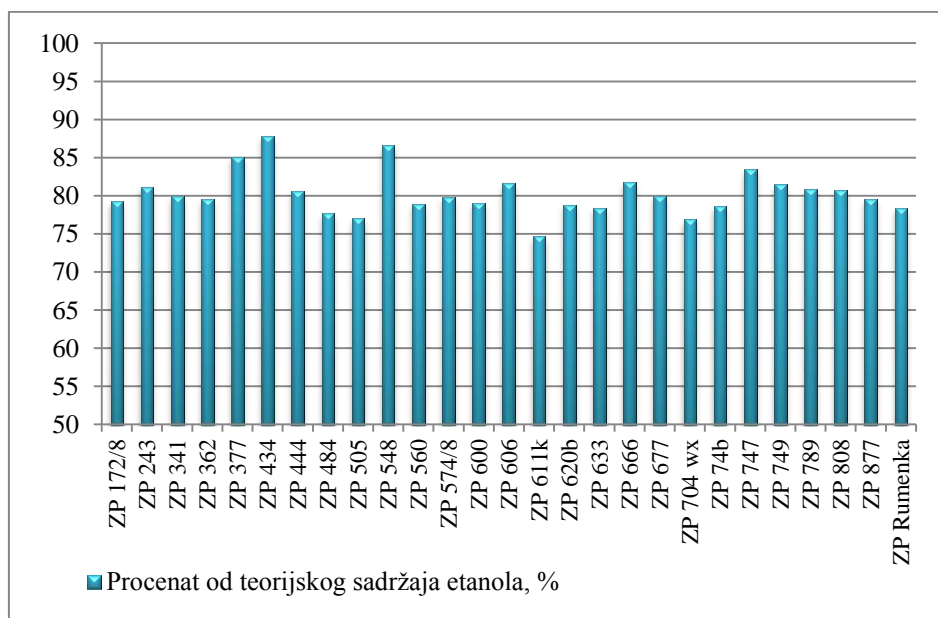
Genotip	Sadržaj etanola , % (w/w)	Procenat od teorijskog sadržaja etanola, %	Prinos etanola, $Y_{P/S}, \text{g g}^{-1}$	Volumetrijska produktivnost, P $\text{g l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
ZP 172/8	8,18	79,26	0,447	1,70
ZP 243	8,45	81,17	0,460	1,76
ZP 341	7,97	79,94	0,453	1,66
ZP 362	8,41	79,56	0,451	1,75
ZP 377	8,75	85,12	0,482	1,75
ZP 434	8,96	87,84	0,498	1,87
ZP 444	8,25	80,64	0,457	1,72
ZP 484	7,66	77,69	0,440	1,60
ZP 505	8,01	77,02	0,437	1,67
ZP 548	8,83	86,57	0,490	1,84
ZP 560	8,09	78,93	0,447	1,68
ZP 574/8	8,15	79,82	0,452	1,70
ZP 600	8,33	79,03	0,448	1,74
ZP 606	8,46	81,66	0,462	1,76
ZP 611k	7,25	74,66	0,423	1,51
ZP 620b	8,18	78,81	0,446	1,70
ZP 633	8,17	78,41	0,444	1,70
ZP 666	8,61	81,84	0,464	1,79
ZP 677	8,46	79,96	0,453	1,76
ZP 704 wx	8,07	76,86	0,435	1,68
ZP 74b	8,35	78,63	0,446	1,74
ZP 747	8,75	83,41	0,472	1,82
ZP 749	8,48	81,46	0,462	1,77
ZP 789	8,43	80,82	0,458	1,76
ZP 808	8,52	80,68	0,457	1,78
ZP 877	8,41	79,49	0,450	1,75
ZP Rumenka	7,25	78,29	0,444	1,51
Minimum	7,25	74,66	0,423	1,51
Maksimum	8,96	87,84	0,498	1,87
Prosek	8,27	80,28	0,455	1,72

Na slikama 6.11. i 6.12. dati su uporedni prikaz ostvarenih prinosa bioetanola nakon 24h i 48h fermentacije SSF procesom i prikaz ostvarenih prinosa nakon 48h kao procenta od teorijskog sadržaja bioetanola.



Slika 6.11. Uporedni prikaz ostvarenih prinosa bioetanola nakon 24 i 48h fermentacije SSF procesom izraženih kao procentualni sadržaj etanola (uslovi su kao u tabelama 6.15 i 6.16)

Iz podataka prikazanih na slici 6.11. može se zaključiti da se brzina proizvodnje bioetanola pojedinih hibrida razlikuje, odnosno da viši prinos nakon 24h ne znači nužno i viši krajnji prinos ovog alkohola.



Slika 6.12. Prikaz ostvarenih prinosa bioetanola nakon 48h fermentacije kao procenata od teorijskog sadržaja etanola

Kao što se može zaključiti iz podataka prikazanih u tabeli 6.16. i na slikama 6.11. i 6.12, najviše prinose bioetanola nakon 48h fermentacije ostvarili su hibridi ZP 434, ZP 548, ZP 377, ZP 747, ZP 666, ZP 808, ZP 606 (8,96%, 8,83%, 8,75%, 8,75%, 8,61% i 8,52%, 8,46 redom).

Ovi hibridi se po tipu endosperma mogu svrstati u zubane žutog zrna. Lemuz i saradnici (2009) su ispitivali prinos bioetanola iz pet različitih tipova hibrida. Ustanovili su da su najveći prinos bioetanola dali redom: kukuruz zuban, voskovac, kukuruz belog zrna, kukuruz sa većim udelom ulja i na kraju visokoamilozni kukuruz.

Najveću volumetrijsku produktivnost bioetanola ostvario je hibrid ZP 548. Najniži prinos bioetanola ostvarili su ZP Rumenka i ZP 611k. Niski prinosi bioetanola kod ova dva hibrida bili su i očekivani kao posledica visokog udela omotača (perikarpa) u strukturi zrna (8,00% i 9,68%, tabela 6.3) i maksimalnog udela tvrde frakcije kod hibrida ZP 611k (tabela 6.2).

Zavisnost prinosa bioetanola od fizičkih i hemijskih svojstava hibrida kukuruza određivana je primenom korelacione analize. Rezultati su prikazani u tabelama 6.17. i 6.18.

Tabela 6.17. Koeficijenti korelacije između parametara prinosa etanola i fizičkih karakteristika zrna hibrida kukuruza

	AM	HM	G	IF
Sadržaj etanola	0,51**	-0,72**	-0,44*	0,49**
Procenat od teorijskog sadržaja etanola	0,39*	-0,59**	-0,48*	0,52**
Prinos etanola, ($Y_{P/S}$, g g⁻¹)	0,39*	-0,59**	-0,48*	0,52**
Volumetrijska produktivnost	0,54**	-0,72**	-0,46*	0,50**
	OM	IAV	MF	TF
Sadržaj etanola	-0,41*	0,16	0,69**	-0,69**
Procenat od teorijskog sadržaja etanola	-0,35	0,37	0,82**	-0,82**
Prinos etanola, ($Y_{P/S}$, g g⁻¹)	-0,35	0,37	0,82**	-0,82**
Volumetrijska produktivnost	-0,45*	0,15	0,69**	-0,69**

AM–apsolutna masa, (g); HM–hektolitarska masa, (kg·m⁻³); G–gustina, (g·cm⁻³); IF–indeks flotacije (%); OM–otpornost na mlevenje, (s); TF - udeo tvrde frakcije (%); MF – udeo meke frakcije (%); IAV– indeks apsorpcije vode.

Korelacija je značajna za koeficijent poverljivosti P: *0,05; **0,01

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.17. može se zaključiti da postoji veoma značajna negativna korelacija između procenta od teorijskog sadržaja etanola i sadržaja tvrde frakcije endosperma ($r = - 0,82$), a takođe veoma značajna negativna korelacija između prinosa etanola po gramu supstrata i udela tvrde frakcije ($r = - 0,82$). Utvrđena je veoma značajna pozitivna korelacija između procenta od teorijskog sadržaja etanola i

sadržaja meke frakcije endosperma u zrnu ($r = 0,82$), a takođe i između prinosa etanola po gramu supstrata i udela meke frakcije, kao i između volumetrijske produktivnosti i udela meke frakcije ($r = 0,69$). Iz rezultat korelacione analize prikazanih u tabeli 6.17. se može uočiti da postoji veoma značajna negativna korelacija između udela tvrde frakcije endosperma i sadržaja etanola ($r = -0,69$), kao i između udela tvrde frakcije endosperma i promenljivih: sadržaja etanola, procenta od teorijskog sadržaja etanola, prinosa etanola po gramu i volumetrijske produktivnosti ($r = -0,69$; $r = -0,82$, $r = -0,82$; $r = -0,69$). Veoma značajne pozitivne korelacije zavisnosti utvrđene su između indeksa flotacije i promenljivih: sadržaja etanola, procenta od teorijskog sadržaja etanola, prinosa etanola po gramu i volumetrijske produktivnosti ($r = 0,49$; $r = 0,52$; $r = 0,52$; $r = 0,50$). Značajna negativna korelacija je utvrđena između otpornosti na mlevenje i sadržaja etanola ($r = -0,41$) kao i između otpornosti na mlevenje i volumetrijske produktivnosti ($r = -0,45$).

Skorija istraživanja koja su sprovedi na različitim sortama pšenice Agu i sar., (2009) i Swanson i sar., (2012) pokazala su da postoji negativna korelacija između prinosa alkohola i tvrdoće zrna pšenice ali i značajna pozitivna korelacija između prosečne tvrdoće zrna i sadržaja proteina kod svih ispitanih sorti pšenice. U istraživanjima koja su prikazana u ovoj disertaciji, na ZP hibridima, utvrđena je veoma značajna pozitivna korelacija između sadržaja tvrde frakcije endosperma i sadržaja proteina ($r = 0,62$).

Tabela 6.18. Koeficijenti korelacije između parametara prinosa etanola i hemijskog sastava zrna hibrida kukuruza

	Sadržaj skroba	Sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata	Sadržaj proteina	Sadržaj ulja	Sadržaj celuloze	Sadržaj pepela
Sadržaj etanola	0,71**	-0,46*	-0,68**	-0,20	-0,17	-0,46*
Procent od teorijskog sadržaja etanola	0,18	-0,30	-0,40*	0,06	-0,24	-0,13
Prinos etanola, ($Y_{P/S}$, $g\ g^{-1}$)	0,17	-0,30	-0,40*	0,05	-0,23	-0,14
Volumetrijska produktivnost	0,73**	-0,46*	-0,69**	-0,23	-0,17	-0,49**

Koeficijent poverljivosti P: *0,05; ** 0,01

Veoma značajna pozitivna korelacija utvrđena je između sadržaja etanola (prinosa etanola izraženog u procentima) i sadržaja skroba u zrnu ($r = 0,71$) (tabela 6.18). S obzirom da na prinos etanola utiče više faktora, sadržaj skroba ne može biti

jedini prediktor stvarnog prinosa bioetanola. Utvrđena je značajna negativna korelacija između sadržaja etanola i koncentracije rastvorljivih ugljenih hidrata ($r = -0,46$). Dobijeni koeficijenti korelacije nisu ukazali da postoji značajna korelacija između prinosa etanola i sadržaja ulja i celuloze.

Ranije sprovedene studije su pokazale da se veliki prinosi etanola mogu postići iz zrna koja sadrže više skroba a manje proteina i lipida (Wu i sar., 2006; Srichwong i sar., 2009). Srcichuwong i saradnici (2010) zaključili su ispitujući podobnost brašna četiri linije kukuruza za proizvodnju etanola da je najbolji prinos ostvario hibrid sa najvećim sadržajem skroba i najmanjim sadržajem lipida i proteina. U njihovom eksperimentu je linija sa najvišim sadržajem proteina imala najmanju efikasnost proizvodnje etanola. U eksperimentima predstavljenim u ovoj disertaciji utvrđena je značajna negativna korelacija između sadržaja etanola i sadržaja proteina u zrnu ($r = -0,68$). Agu i saradnici (2009) takođe su ustanovili značajnu negativnu korelaciju između prinosa etanola iz pšenice i sadržaja ukupnog azota (na osnovu kojeg se određuje koncentracija proteina).

Identifikovanje hibrida kukuruza sa potencijalom za više prinose bioetanola može značajno povećati efikasnost procesa proizvodnje ovog biogoriva od kukuruza (Lemuz i sar., 2009). Procedura kojom bi se mogao tačno predvideti potencijal određenih hibrida bio bi od velike koristi kompanijama koje se bave genetikom, selekcijom i proizvodnjom kukuruza, proizvodnjom bioetanola, kao i samim uzgajivačima kukuruza.

Većina studija ukazala je da je potrebno sprovesti dalja istraživanja kako bi se preciznije utvrdile eksperimentalne promenljive koje utiču na prinos etanola (Lemuz i sar., 2009).

Kod proizvodnje etanola iz drugih biljnih sirovina primećene su određene korelacije između hemijskog sastava i prinosa etanola. Zhan i sar., (2003) su ustanovili za osam sorti sirka značajnu pozitivnu korelaciju između ukupnog skroba i prinosa etanola ($r^2 = 0,25$, $r = 0,5$) kao i veoma značajnu negativnu korelaciju između sadržaja proteina i prinosa etanola ($r^2 = 0,71$, $r = -0,84$). Oni su zaključili da genetička osnova i lokacija odnosno uslovi gajenja imaju veliki uticaj na prinos etanola. Prema tome, najefikasniji način ispitivanja fermentabilnosti pojedinih hibrida i prinosa etanola jeste direktno merenje. Potrebno je izvršiti opsežnija istraživanja kako bi se ustanovila idealna korelacija između fizičkih karakteristika i hemijskog sastava zrna kukuruza i prinosa etanola kojom bi se mogao predvideti tačan prinos etanola.

6.3. MOGUĆNOSTI ISKORIŠĆENJA SPOREDNOG PROIZVODA PROCESA FERMENTACIJE - SUVE KUKURUZNE DŽIBRE SA RASTVORENIM MATERIJAMA KAO HRANIVA ZA ŽIVOTINJE

6.3.1. Ispitivanje kvaliteta suve kukuruzne džibre i mogućnosti njene primene i mogućnosti njene primene kao hraniva za pripremu smeša za ishranu životinja

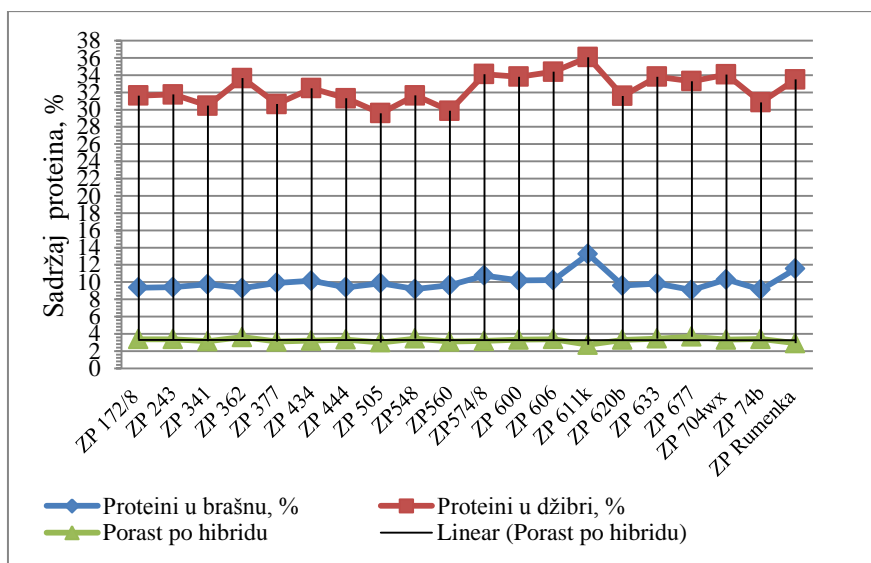
U eksperimentima su korišćeni uzorci kukuruzne džibre dobijene procesom odvojene hidrolize i fermentacije pod uslovima navedenim u odeljku 6.2.2.2. Uzorci ukupne džibre hibrida kukuruza sušeni su u ventilacionoj sušnici na temperaturi 60°C u trajanju od 48h. Osušeni uzorci su prvo usitnjeni u avanu a potom samleveni u laboratorijskom mlinu sa rotirajućim sečivom i rashladnom komorom. Rezultati ispitivanja sadržaja suve materije, proteina i svarljivosti suve materije suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama prikazani su u tabeli 6.19.

Tabela 6.19. Sadržaj suve materije i proteina i svarljivost suve materije ispitivanih uzoraka suve kukuruzne džibre

Genotip	Sadržaj suve materije, %	Sadržaj proteina, %	Svarljivost suve materije, %
ZP 172/8	90,96	31,62	79,70
ZP 243	90,97	31,75	80,57
ZP 341	90,99	30,45	77,02
ZP 362	91,87	33,66	79,02
ZP 377	90,86	30,65	77,02
ZP 434	91,00	32,48	78,78
ZP 444	90,75	31,31	78,33
ZP 505	91,86	29,58	82,41
ZP548	91,11	31,65	77,28
ZP560	91,32	29,86	81,98
ZP574/8	91,61	34,12	82,32
ZP 600	91,64	33,81	82,38
ZP 606	90,81	34,40	77,12
ZP 611k	90,82	36,08	76,61
ZP 620b	91,55	31,60	78,60
ZP 633	91,34	33,81	79,94
ZP 677	91,57	33,30	75,90
ZP 704wx	90,81	34,08	81,88
ZP 74b	90,97	30,85	78,47
ZP Rumenska	90,47	33,51	74,09
Minimum	90,47	29,58	74,09
Maksimum	91,87	36,08	82,41
Prosek	91,16	32,43	78,97

Sadržaj suve materije kretao se od 90,47% (ZP Rumenka) do 91,87% (ZP 362) (tabela 6.19), što znači da je sadržaj vlage u svim uzorcima suve kukuruzne džibre bio manji od 12%, maksimalne vrednosti prema pravilniku o kvalitetu hrane za životinje (Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, 2010). Prema Odboru za žitarice SAD (U.S. Grain Council, 2012) preporučeni sadržaj vlage u suvoj kukuruznoj džibri iznosi 11%, što znači da su svi ispitani uzorci džibre ispunili taj kriterijum. Sadržaj proteina u uzorcima suve kukuruzne džibre bio je u okviru vrednosti koje preporučuje Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje Republike Srbije (2010). Prema ovom pravilniku kukuruzna džibra treba da sadrži minimalno 25% proteina, do 20% celuloze i do 6% pepela.

Poređenjem sadržaja proteina u uzorcima suve kukuruzne džibre (tabela 6.19) sa sadržajem proteina u brašnu celog zrna hibrida kukuruza (tabela 6.4) može se zaključiti da se sadržaj proteina u uzorcima džibre više nego udvostručio u odnosu na kukuruzno zrno odgovarajućih hibrida kao polazne sirovine (slika 6.13).



Slika 6.13. Porast sadržaja proteina u suvoj kukuruznoj džibri u odnosu na brašno celog zrna kukuruza

U opštem slučaju, proteini kukuruzne džibre potiču iz dva glavna izvora – kvasca i zrna kukuruza. Tokom rasta, kvasac fermentiše skrob i proizvodi ćelijsku masu koja je većim delom izgrađena od proteina (Belyea i sar., 2004). Stoga jedan deo proteina kukuruzne džibre vodi poreklo od kvasca. S obzirom da kvasci ne poseduju proteolitičke enzime, oni ne mogu da razgrade proteine kukuruza, iz tog razloga proteini kukuruznog zrna ostaju u džibri gde se obogaćuju proteinima kvasca. Sadržaj proteina u ispitivanim uzorcima suve kukuruzne džibre bio je viši od najmanjeg (25%) koji

preporučuje Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje Republike Srbije za ovo hranivo Najveći sadržaj proteina određen je u uzorku džibre dobijene od hibrida ZP 611 k (36,08%, tabela 6.19), potom u džibrama sledećih hibrida ZP 606, ZP 574/8 i ZP 704 wx.

Svarljivost suve materije uzoraka kukuruzne džibre određena pepsin-celulaznom metodom, kretala se u rasponu od 74,09% (ZP Rumenka) do 82,41% (ZP 505) (tabela 6.19). Utvrđena je veoma visoka svarljivost suve materije kukuruzne džibre hibrida voskovca ZP 704wx (81,88%) (tabela 6.19). Voštani hibridi sadrže približno 100% amilopektinske komponente skroba, za razliku od kukuruza zubana kod kojih je odnos amilopektina i amiloze 72:28%. Neki istraživači utvrdili su da upotreba voštanih hibrida kukuruza kao zamene za kukuruz zuban ima pozitivne efekte u ishrani krava muzara u periodu laktacije, kao i kod prirasta goveda (Akay i sar., 2001). Drugi istraživači smatraju da je bolje koristiti kukuruz voskovic nego kukuruz zuban žutog zrna u ishrani preživara upravo zbog visoke svarljivosti amilopektina u buragu preživara (Mohd i sar., 1984). Dobra svarljivost suve materije voštanog hibrida ZP 704 wx može se pripisati najvećim delom visokoj svarljivosti amilopektina.

Svi koeficijenti svarljivosti suve materije kukuruzne džibre su viši od koeficijenta svarljivosti suve materije cele biljke kukuruza. Terzić i saradnici (2010) objavili su vrednosti svarljivosti suve materije cele biljke kukuruza u rasponu od 58,09 do 66,65%. Ranije objavljeni podaci o svarljivosti suve materije zrna kukuruza dva ZP hibrida iznosili su 83,90 % za ZP 633 i 81,67% za ZP Rumenku (Radosavljević i sar., 2010). Viša svarljivost suve materije zrna kukuruza od svarljivosti suve materije kukuruzne džibre može se objasniti nižim sadržajem celuloze i pepela i višim sadržajem lakosvarljivih ugljenih hidrata (uglavnom skroba) u zrnu kukuruza. Koeficijent korelacije ($r = -0,15$) ukazuje da sadržaj proteina nema statistički značajan uticaj na svarljivost suve materije.

U tabeli 6.20. prikazan je prosečan hemijski sastav ispitanih uzoraka suve kukuruzne džibre odabranih hibrida kukuruza.

Tabela 6.20. Hemijski sastav ispitivanih uzoraka suve kukuruzne džibre

Genotip	Sadržaj suve materije, %	Sadržaj proteina, %	Sadržaj ulja, %	Sadržaj pepela, %	Sadržaj BEM, %	Sadržaj ukupnih vlakana (sirova celuloza), %
ZP 434	91,00	32,48	11,28	5,65	41,32	9,27
ZP 611k	90,82	36,08	10,67	6,17	39,06	8,02
ZP 633	91,34	33,81	11,75	5,80	39,58	9,06
ZP 704wx	90,81	34,08	10,43	5,77	41,12	8,60
ZP 74b	90,97	30,85	10,82	5,85	42,33	10,15
ZP Rumenka	90,47	33,51	12,03	5,87	39,60	8,99

Sadržaj ulja u uzorcima suve kukuruzne džibre kretao se rasponu od 10,43 do 12,03%, slične vrednosti su objavili Spiehs i sar. (2002) i Belyea i sar. (2004). Kim i saradnici (2008) objavili su sadržaj ulja od 11,6% u suvoj kukuruznoj džibri. Procenat pepela u ispitivanim uzorcima suve kukuruzne džibre varirao je između 5,65 i 6,17%, bezazotnih materija od 39,06 do 42,32% a ukupnih vlakana (sirove celuloze) od 8,02 do 10,15%. Au isaradnici (2010) navode nešto niži procenat pepela (4,4%) i ulja (5,7%). Spiehs i saradnici (2002) su na osnovu 118 ispitanih uzoraka suve džibre iz različitih postrojenja u Minesoti i Južnoj Dakoti objavili vrednosti navedenih parametara slične rezultatima ove disertacije. Ovi autori su u svom radu zaključili da hemijski sastav suve kukuruzne džibre varira ne samo u zavisnosti od vrste sirovine, postupka fermentacije i procesne tehnologije, već da se i u okviru samog postrojenja razlikuje od šarže do šarže. Zbog toga preporučuju da se barem jedanput godišnje proverava hemijski sastav suve džibre koja se dodaje smešama za ishranu domaćih životinja. Takođe su zaključili da je džibra koja vodi poreklo od kukuruza bogatija po sadržaju ulja, ima veću svarljivu i metaboličku energiju, udeo aminokiselina lizina, metionina i treonina nego džibra drugih žitarica, i da je stoga pogodnija za ishranu domaćih životinja, prevashodno svinja.

U tabeli 6.21. prikazane su računskim putem dobijene vrednosti sadržaja pojedinih aminokiselina u suvoj kukuruznoj džibri.

Tabela 6.21. Sadržaj pojedinih aminokiselina u uzorcima džibre izračunat prema jednačinama koje su predložili Fiene i sar., (2006)

Amino kiselina	Genotip					
	ZP 434	ZP 611k	ZP 633	ZP 704wx	ZP 74b	ZP Rumenka
Arginin	1,37	1,52	1,42	1,44	1,31	1,41
Izoleucin	1,22	1,36	1,29	1,28	1,15	1,28
Leucin	3,88	4,31	4,09	4,03	3,64	4,01
Lizin	1,03	1,16	1,08	1,09	0,97	1,07
Metionin	0,67	0,74	0,70	0,69	0,63	0,70
Cistein	0,66	0,72	0,68	0,69	0,64	0,68
TSAA	1,32	1,44	1,36	1,37	1,26	1,35
Treonin	1,19	1,31	1,23	1,24	1,13	1,22
Triptofan	0,25	0,28	0,26	0,27	0,24	0,26
Valin	1,62	1,78	1,69	1,68	1,53	1,68

Spiels i saradnici (2002) objavili su veći raspon vrednosti sadržaja arginina (0,92 - 2,17 %), i nešto niži sadržaj leucina (2,97 - 3,81%). Prema Odboru za žitarice SAD (U.S. Grain Council, 2012) sadržaj lizina suve kukuruzne džibre trebalo bi da se kreće u rasponu od 0,61 do 1,06%, arginina 1,01 - 1,48%, triptofana 0,18 - 0,28%, metionina 0,54 - 0,76%. Izračunate vrednosti za aminokiseline se u većini slučajeva slažu sa navedenim prosecima Odbora za žitarice SAD.

Vrednosti sadržaja strukturalnih ugljenih hidrata (lignoceluloznih vlakana) u uzorcima suve kukuruzne džibre prikazani su u tabeli 6.22.

Tabela 6.22. Vrednosti sadržaja strukturalnih ugljenih hidrata uzoraka džibre

Genotip	Sadržaj NDF-a, %	Sadržaj ADF-a, %	Sadržaj ADL-a, %	Sadržaj hemiceluloze, %	Sadržaj celuloze, %
ZP 434	33,81	9,27	1,05	24,54	8,22
ZP 611k	31,41	8,02	0,64	23,39	7,38
ZP 633	36,25	9,06	2,20	27,19	6,86
ZP 704wx	34,16	8,59	2,16	25,49	6,44
ZP 74b	38,27	10,15	1,51	28,12	8,64
ZP Rumenka	31,79	8,99	1,15	22,79	7,84

Sadržaj NDF-a u ispitivanim uzorcima suve kukuruzne džibre kretao se od 31,41% (ZP 611k) do 38,27% (ZP 74b), ADF-a od 8,02% (ZP 611k) do 10,15% (ZP 74b). Sadržaj NDF-a, ADF-a, ADL-a, hemiceluloze i celuloze u suvoj kukuruznoj džibri viši je nego u celom zrnu kukuruza. Radosavljević i saradnici (2012) konstatovali su da se u celom zrnu kukuruza kod sedam ispitivanih ZP hibrida sadržaj NDF-a kretao

od 17,59 – 28,84%, ADF-a od 3,89 – 4,88%, ADL-a od 0,34 – 1,08%, hemiceluloze od 13,23 – 24,64% i celuloze od 2,79 – 4,54%. Povećan sadržaj NDF-a i ADF-a – lignoceluloznih (dijetetskih) vlakana u kukuruznoj džibri u odnosu na zrno kukuruza i njeno korišćenje u ishrani dovodi do poboljšanja stanja u rumenu (buragu) preživara. Prosečan sadržaj NDF-a i ADF-a u ispitanim uzorcima suve kukuruzne džibre približan je propisanim vrednostima sadržaja ovog nutrijenta u smešama za ishranu svinja. Prema Odboru za žitarice SAD (U.S. Grain Council, 2012) prosečne vrednosti NDF-a u kukuruznoj džibri se kreću između 20,1 – 32,9%, a ADF-a između 7,2 i 17,3%. Sadržaj NDF-a i ADF-a u ispitivanim uzorcima suve kukuruzne džibre bio je u opsegu koji za ove hranljive materije propisuje pravilnik je u skladu sa pravilnikom Odbora za žitarice SAD (U.S. Grain Council, 2012). Au i sar., (2010) navode vrednosti sadržaja NDF-a od 32,9% i ADF-a od 15,5% u suvoj kukuruznoj džibri. Uzimajući u obzir uticaj sadržaja lignoceluloznih vlakana na svarljivost suve materije kukuruzne džibre može se zaključiti da je ona veoma kvalitetno hranivo. Može se koristiti u smešama za ishranu različitih vrsta i kategorija životinja, prvenstveno preživara.

Izračunate vrednosti svarljive i metaboličke energije suve kukuruzne džibre prikazane su u tabeli 6.23.

Tabela 6.23. Svarljiva i metabolička energija uzoraka suve džibre

Genotip	Sadržaj svrljive energije, SE		Sadržaj metaboličke energije, ME	
	MJ·kg ⁻¹	kcal kg ⁻¹	MJ·kg ⁻¹	kcal kg ⁻¹
ZP 434	16,93	4044,1	15,83	3780,4
ZP 611k	17,25	4120,3	16,00	3820,5
ZP 633	17,11	4087,7	15,95	3809,7
ZP 74b	16,36	3908,4	16,18	3865,7
ZP 704 _{wx}	17,07	4076,8	15,90	3797,3
ZP Rumenka	17,11	4087,4	15,96	3812,0

Sadržaj svarljive energije u uzorcima suve kukuruzne džibre ispitivanih ZP hibrida kretao se od 16,36 MJ kg⁻¹ (ZP 74b) do 17,25 MJ·kg⁻¹ (ZP 611k) a metaboličke energije od 15,83 MJ kg⁻¹ (ZP 434) do 16,18 MJ kg⁻¹ (ZP 74b). Sve ispitivane suve kukuruzne džibre imale su visok sadržaj kako svarljive tako i metaboličke energije pa spadaju u grupu kako proteinskih tako i visoko energetskih hraniva. Stein i Shurson (2009) navode prosečne vrednosti sadržaja svarljive energije 4088 kcal kg⁻¹ (17,12 MJ kg⁻¹) i metaboličke energije 3989 kcal kg⁻¹ (16,70 MJ kg⁻¹) iz deset različitih uzoraka

suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama koja je korišćena u ishrani svinja. Spiehs i sar., (2002) objavili su rezultate sitrađivanja u kojem su se vrednosti sadržaja svarljive energije kretali u rasponu od 3879 do 4084 kcal kg⁻¹ (16,24 - 17,10 MJ kg⁻¹), a metaboličke energije od 3661 do 3838 kcal kg⁻¹ (15,33 – 16,07 MJ kg⁻¹)

Najveća prednost kvalitetne suve kukuruzne džibre u odnosu na brašno od kukuruznog glutena i hranivo od kukuruznih mekinja kao i suvi pivski trop jeste visoki sadržaj ulja i iskoristivog fosfora. Vrednosti za sadržaj svarljive i metaboličke energije suve kukuruzne džibre znatno su više od vrednosti ovih energija izračunatih za hraniva od vrednosti sadržaja ovih energija izračunatih za hraniva od kukuruznih mekinja i pivskog tropa (US Grains Council, 2012).

Izračunate vrednosti sadržaja svarljive i metaboličke energije ispitivanih uzoraka suve kukuruzne džibre proporcionalne su vrednostima energetske potrebe svinja koje je objavio Nacionalni istraživački odbor Sjedinjenih država (NRC, 1998).

Prosečan sadržaj mineralnih materija određenih u uzorcima suve kukuruzne džibre nije značajno varirao od hibrida do hibrida (tabela 6.24).

Tabela 6.24. Prosečan sadržaj mineralnih materija u uzorcima suve kukuruzne džibre

Mikroelement	Prosečna vrednost, g kg⁻¹
Fosfor - P	13,63
Kalcijum - Ca	2,87
Bakar - Cu	$< 2,5 \cdot 10^{-3}$
Gvožđe - Fe	$4,77 \cdot 10^{-2}$
Magnezijum - Mg	1,33
Mangan - Mn	$8,63 \cdot 10^{-3}$
Kalijum - K	12,39
Natrijum - Na	$1,00 \cdot 10^{-4}$
Cink - Zn	$6,61 \cdot 10^{-2}$

Prosečne vrednosti sadržaja mikroelemenata od velikog značaja za ishranu domaćih životinja - kalcijuma i fosfora, određene u uzorcima džibre iznosile su 2,87 g kg⁻¹ i 13,63 g kg⁻¹, respektivno. Ove vrednosti su u skladu sa preporukama Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje (2010). Prosečan sadržaj fosfora bio je nešto iznad vrednosti preporučenih za većinu potpunih smeša (6,0 – 8,0 g kg⁻¹), osim za dopunske smeše za ishranu svinja i tov junadi za koje je gornja granica 26 g kg⁻¹. Spiehs i saradnici (2002) objavili su vrednosti između 8,3 i 10,2 g kg⁻¹. Fosfor je veoma skupa hranljiva materija neophodna za ishranu životinja i ima veliki značaj u planiranju upravljanja organskim

đubrivom (Cromwell, 1979). Međutim, u poređenju sa režimom ishrane baziranom na kukuruзу i soji, iskoristivost fosfora se poboljšava u kukuruznoj džibri zahvaljujući fermentaciji za vreme koje se deo fitatnog fosfora iz kukuruza hidrolizuje pod dejstvom mikrobne fitaze kvasca (Cromwell, 1979). Utvrđene vrednosti koncentracije cinka i magnezijuma za suhu kukuruznu džibru po sadržaju su zadovoljavajuće tako da se ova džibra može koristiti kao komponenta za većinu smeša, dok je po sadržaju gvožđa najpogodnija za smeše koje se koriste u ishrani živine i goveda. Srednja vrednost koncentracije kalijuma iznosila je 12,39 g kg dok su Spiehs i saradnici (2002) objavili nešto niže vrednosti između 9,0 i 10,8 g kg⁻¹. Prema izveštaju Odbora za žitarice Sjedinjenih država (U.S. Grains Council, 2012) kvalitetna suva kukuruzna džibra treba da sadrži prosečno 8,4 g kg⁻¹.

Korišćenje suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama u kombinaciji sa drugim hranivima obroka kao i komponente u smešama (potpune, dopunske) doprinosi poboljšanju ukusa i iskorišćenja kompletnog obroka i smeša koje se koriste u ishrani domaćih životinja.

Shodno tome u svetu postoji tendencija da se poveća udeo suve kukuruzne džibre u kombinaciji sa drugim hranivima obroka i u smešama (potpune, dopunske) za ishranu različitih vrsta i kategorija domaćih životinja.

Objavljeni su brojni radovi na temu korišćenja suve kukuruzne džibre u ishrani životinja.

Niemiec i sar. (2013) smatraju da udeo suve kukuruzne džibre preko 15% u potpunim smešama za ishranu koka nosilja dovodi do blagog pada proizvodnih rezultata (smanjenja nosivosti) i pogoršanja ispitivanih parametara kvaliteta jaja. Prema Loaru i sar. (2010) 16% suve kukuruzne džibre u smeši za koke nosilje daje najbolje proizvodne rezultate u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom sa različitim udelom suve kukuruzne džibre. Lumpikns i sar. (2004) zaključili su da udeo suve kukuruzne džibre u smeši za početni tov brojlera može biti 6%, a 12-15% maksimalno u ostalim fazama tova brojlera. Noll i Brannon (2005) smatraju da bi udeo suve kukuruzne džibre mogao da bude do 20% u smešama za porast i završni tov ćurki. Huang i sar. (2006) objavili su rezultate koji ukazuju da dodavanje do 18% suve kukuruzne džibre u smeše za ishranu pataka nosilja nije imalo značajan uticaj na količinu unete hrane, konverziju hrane i kvalitet ljuske jaja. Kod pataka nosilja koje su hranjene smešom sa 18% kukuruzne džibre proizvodnja jaja se tokom zime povećala.

Upotreba suve kukuruzne džibre u ishrani svinja sve se više povećava. Mnogi odgajivači dodaju 20% suve kukuruzne džibre u smeše za sve kategorije svinja. Iako se ovaj procenat preporučuje, neki odgajivači koriste suhu kukuruznu džibru i u većem procentu (do 30%) za ishranu svinja i prasadi u porastu i tovu. Zbog rizika da veći udeo suve kukuruzne džibre u ishrani svinja negativno utiče na kvalitet (čvrstinu) slanine, ovaj udeo bi trebalo ograničiti na 20% dok se negativni uticaj detaljno ne ispita. Pri formulisanju smeša sa suvom kukuruznom džibrom za ishranu različitih kategorija svinja treba obratiti pažnju da se zadovolje potrebe za svarljivim amino kiselinama i usvojivim fosforom, kao i za odnosom lizina i proteina. Odnos lizina i proteina ne bi trebalo da bude niži od 2,80 u smešama za ishranu svinja (Stein, 2007).

U svim fazama tova junadi udeo suve kukuruzne džibre može biti 40% od suve materije obroka. Sa ovakvim udelom suve kukuruzne džibre u obroku za tov junadi ostvaruju se veći prirast, bolji kvalitet mesa i polutki. Suva kukuruzna džibra kao dodatak hranivima obroka za ishranu junadi u tovu koristi se kao izvor proteina da bi se smanjio udeo glutenskog i sojinog brašna u obroku, naročito u kombinaciji sa silažom lošijeg kvaliteta, 2) kao izvor lignoceluloznih vlakana (NDF) kao zamena za kukuruzno glutensko brašno i sojine ljuspice 3) kada je potrebno povećati sadržaj masti u obroku (U.S. Grains Council, 2012).

6.4. TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE MOKROG MLEVENJA ODABRANIH HIBRIDA KUKURUZA

Prinos, iskorišćenje i čistoća skroba, odnosno sadržaj proteina u izolovanom skrobu, predstavljaju najznačajnije parametre pri ocenjivanju tehnološke vrednosti zrna hibrida kukuruza u mokroj preradi. Visok stepen iskorišćenja i prinos skroba, kao i nizak sadržaj proteina u dobijenom skrobu, osnovni su pokazatelji dobro izvedenog postupka mokrog mlevenja kukuruza. Prinos skroba predstavlja odnos količine dobijenog skroba i polazne količine zrna, dok je iskorišćenje skroba procentualni udeo dobijenog skroba u odnosu na količinu ukupno prisutnog skroba u zrnu.

U tabelama 6.25, 6.26. i 6.27. su prikazani rezultati dobijeni laboratorijskom metodom postupka mokrog mlevenja deset odabranih hibrida kukuruza.

Tabela 6.25. Karakteristike mokrog mlevenja odabranih hibrida kukuruza

Genotip	Prinos suve materije po frakcijama					
	Voda od močenja, %	Klica, %	Mekinje, %	Skrob, %	Gluten, %	Procesna voda, %
ZP 172/8	4,48	8,86	10,30	62,41	6,53	0,22
ZP 243	4,55	8,76	9,96	61,67	7,05	0,21
ZP 341	4,22	7,65	10,15	66,34	7,04	0,20
ZP 434	4,21	8,18	10,52	65,25	6,71	0,23
ZP 505	4,25	8,21	9,18	62,32	6,43	0,19
ZP 548	4,70	8,15	8,43	64,29	6,52	0,17
ZP 677	4,28	8,05	8,32	67,43	6,54	0,20
ZP 704wx	4,56	7,85	9,84	66,99	6,15	0,18
ZP 808	4,33	7,27	8,75	68,34	5,64	0,16
ZP Rumenka	4,41	9,31	12,52	61,19	8,23	0,15
Minimum	4,21	6,27	8,32	61,19	5,64	0,15
Maksimum	4,70	9,31	12,52	68,34	8,23	0,23

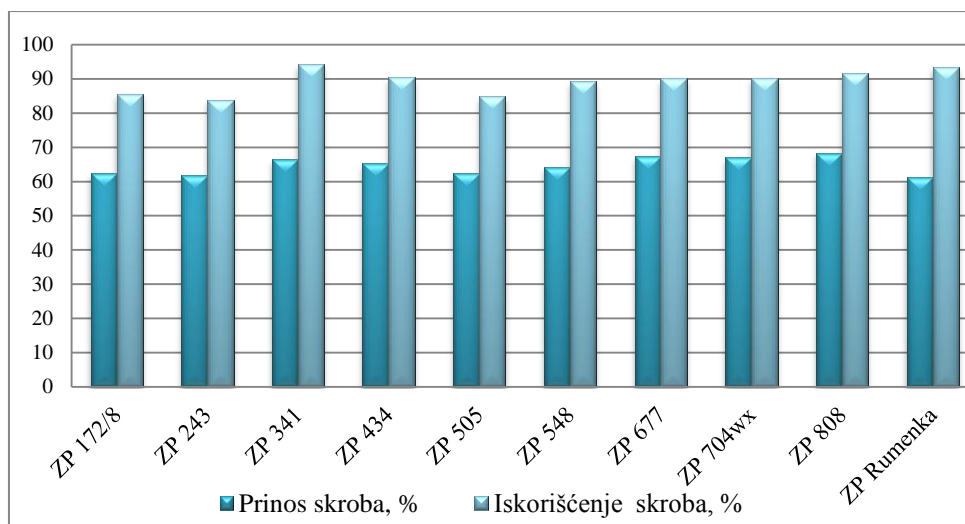
Na osnovu tabelarno prikazanih rezultata može se videti da se prinos skroba ispitanih hibrida kretao u rasponu od 61,19% za ZP Rumenka do 68,34% za ZP 808, što odgovara iskorišćenju skroba od 93,53% i 91,65%. Hibrid ZP 341 je pokazao najveće iskorišćenje skroba od 94,15%, a najmanje iskorišćenje od 83,86% hibrid ZP 243 (tabela 6.25). Eckoff i saradnici (1993) navode da se industrijski prinosi skroba kreću između 64,3-67,5% a laboratorijski između 63,7-67,5%, dok su odgovarajuća iskorišćenja skroba 91,6-99,8%, odnosno 97,9-99,4%. Prinos klice kretao se u rasponu od 6,27% (ZP 808) do 9,31% (ZP Rumenka). Prinos mekinja varirao je od 8,32% (ZP 677) do 12,52% (ZP Rumenka). Visoki prinos mekinja kod hibrida ZP Rumenka

posledica je visokog udela perikarpa u strukturi zrna ovog hibrida (tabela 6.3). Eckoff i saradnici (1993) u svom radu navode da se ostvareni prinosi mekinja kreću između 8,8% i 13,05% a glutena u rasponu 5,7-14,5%. Najveći prinos glutena u ovom istraživanju pokazao je hibrid ZP Rumenka (8,23%) a najmanji ZP 808 (5,64%).

Tabela 6.26. Sadržaj, prinos i iskorišćenje izolovanog skroba odabranih hibrida kukuruza

Genotip	Sadržaj skroba u zrnu, %	Prinos skroba, %	Iskorišćenje skroba, %
ZP 172/8	72,85	62,41	85,61
ZP 243	73,50	61,67	83,86
ZP 341	70,40	66,34	94,15
ZP 434	72,04	65,25	90,49
ZP 505	73,38	62,32	84,91
ZP 548	72,04	64,29	89,20
ZP 677	74,67	67,43	90,15
ZP 704wx	74,13	66,99	90,35
ZP 808	74,55	68,34	91,65
ZP Rumenka	65,38	61,19	93,53

Kao što se može videti i sa grafičkog prikaza (slika 6.14), iako je hibrid ZP 808 ispoljio najveći prinos istaloženog skroba, najveće iskorišćenje je pokazao hibrid ZP 341. Hibrid ZP 808 je takođe imao najniže prinose glutena i klice (tabela 6.25). Koeficijenti korelacije između prinosa skroba i sadržaja skroba u zrnu ($r = 0,50$) kao i između prinosa skroba i iskorišćenja skroba ($r = 0,51$) ukazuju na veoma značajnu pozitivnu korelaciju između ovih promenljivih. Međutim, sadržaj skroba u zrnu kukuruza nije jedini faktor koji utiče na prinos istaloženog skroba. Rezultati su u skladu sa rezultatima ranije sprovedenih istraživanja u Institutu za kukuruz “Zemun Polje” (Milašinović, 2005).



Slika 6.14. Uporedni prikaz prinosa i iskorišćenja skroba odabranih hibrida kukuruza

Eckoff (1999) navodi da varijabilnost prinosa skroba u mokroj preradi najviše zavisi od genetičke osnove (oko 70%), dok je uticaj faktora spoljašnje sredine oko 30 %.

Amiloza i amilopektin iako su izgrađeni isključivo od α -D-glukoze kao monosaharidne komponente, međusobno se znatno razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama. Odnos amiloze i amilopektina u skrobnim granulama predstavlja jedan od najvažnijih parametara koji značajno utiče na funkcionalne osobine skroba. U proseku, normalni kukuruzni skrob se sastoji od 24-26% amiloze i 74-76% amilopektina. Skrobovi određenih vrsta kukuruza, ječma i pirinča označeni kao voštani, sadrže iznad 90% amilopektina, a najčistiji sadrže isključivo amilopektin (Milašinović, 2005). Nasuprot tome, poznati su i skrobovi sa visokim sadržajem amiloze, kao što je slučaj sa visokoamiloznim kukuruzom koji sadrži između 55 i 85% amiloze (Whistler i sar., 1984).

Skrobovi koji sadrže samo jednu polisaharidnu komponentu, imaju specifične osobine i kao takvi proširuju primenu skroba, odnosno kukuruza i otvaraju nove mogućnosti posebnih primena, za koje običan kukuruzni skrob ne može da se koristi (Milašinović, 2005).

Rezultati određivanja sadržaja amiloze i amilopektina u uzorcima skroba izolovanog iz zrna ispitivanih hibrida kukuruza prikazani su u tabeli 6.27.

Tabela 6.27. Sadržaj amiloze i amilopektina u izolovanim skrobovima

Genotip	Sadržaj amiloze, %	Sadržaj amilopektina, %
ZP 172/8	23,7	76,3
ZP 243	24,4	75,6
ZP 341	23,2	76,8
ZP 434	23,6	76,4
ZP 505	25,1	74,9
ZP 548	24,1	75,9
ZP 677	23,8	76,2
ZP 704wx	1,0	99,0
ZP 808	24,1	75,9
ZP Rumenka	23,7	76,3

Sadržaj amiloze u ispitivanim skrobovima kretao se od 1% kod hibrida ZP 704wx do 25,1% kod hibrida ZP 505. Većina ispitivanih skrobova spadaju u grupu takozvanih normalnih skrobova, osim skroba hibrida ZP 704wx koji spada u grupu voštanih. Ovi rezultati su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima istraživanja (Milašinović 2005; Radosavljević i sar., 2009.a).

U tabeli 6.28. prikazani su rezultati ispitivanja sadržaja proteina i svarljivosti skroba izolovanog iz zrna ispitivanih hibrida kukuruza.

Tabela 6.28. Sadržaj proteina i svarljivost skroba izolovanog iz zrna ispitivanih hibrida kukuruza

Genotip	Sadržaj proteina u skrobu, %	Svarljivost izolovanog skroba, %
ZP 172/8	0,21	90,07
ZP 243	0,20	89,56
ZP 341	0,17	90,16
ZP 434	0,26	91,24
ZP 505	0,23	89,84
ZP 548	0,26	91,40
ZP 677	0,27	89,93
ZP 704wx	0,22	92,74
ZP 808	0,16	88,15
ZP Rumenka	0,19	89,72

Sadržaj proteina u izolovanom skrobu se kretao od 0,16 do 0,27 što ukazuje na dobar kvalitet dobijenih skrobova, s obzirom da je prema "Pravilniku o kvalitetu skroba i proizvoda od skroba za prehrambene svrhe" (1996) maksimalna dozvojena granica udela proteina u skrobu 0,4%.

Kao što se može videti iz podataka prikazanih u tabeli 6.28, svarljivost izolovanog nativnog skroba ispitivanih hibrida varirala je u rasponu od 88,15% (ZP 808) do 92,74% (ZP 704 wx). Izračunati koeficijent korelacije između svarljivosti skroba i udela amilopektinske frakcije u molekulu skroba ($r = 0,70$) ukazuje da postoji veoma značajna korelacija između ova dva parametra. Ovi podaci se mogu uporediti sa rezultatima Dadoa i Beeka (1998) koji su za normalne hibride ustanovili svarljivost skroba od prosečno 89,2%, a za visokolizinske (*opaque-2*) hibride čak 95,8%. Ranija ispitivanja svarljivosti nativnog kukuruznog skroba hibrida pokazala su da se ovaj parametar kretao u rasponu od 8,4% za visokoamilozni do 92,8% za voštani kukuruzni skrob nakon 24h hidrolize α -amilazom izolovanom iz svinjskog pankreasa (Radosavljević i sar., 2009.a). Razgradnja skroba u buragu preživara predstavlja najznačajniji izvor energije za ove životinje. Vrednosti svarljivosti skroba, na koju utiče udeo amiloze i amilopektina, može dovesti do promena u samom toku procesa fermentacije u buragu preživara – stvaranja produkata fermentacije (propionske i sirćetne kiseline). Promena koncentracije ovih isparljivih masnih kiselina utiču na promene u prinosu i sastavu mleka (Wester i sar., 1992; Nocek i sar., 1991). Takođe su uočene razlike u svarljivosti skroba u okviru biljne vrste, zbog toga selekcija hibrida može potencijalno biti metoda za izmenu svarljivosti skroba. Wester i saradnici (1992) su uočili da postoji pozitivna korelacija između svarljivosti skroba četiri različite sorte sirka i efikasnosti hraniva pri ishrani junadi. Slične ali nešto slabije korelacije između svarljivosti skroba i efikasnosti hraniva pri ishrani goveda su ustanovili Ladely i saradnici (1995) sa različitim hibridima kukuruza.

Između procenta od teorijskog sadržaja etanola i svarljivosti skroba izračunat je koeficijent korelacije ($r = 0,78$) koji ukazuje da postoji veoma značajna korelacija između ove dve promeljive. S obzirom na značaj hidrolitičke razgradnje skroba do fermentabilnih šećera za što efikasniji proces alkoholnog vrenja ovakva vrednost korelacije je i bila očekivana.

Dien i saradnici (2002) su koristili proceduru da odrede potencijalni prinos etanola i merili prinos izdvojenog skroba laboratorijskom metodom mokrog mlevenja (Eckoff i sar., 1996). Koristili su pet hibrida kukuruza i zaključili da je prinos izdvojenog skroba u značajnoj korelaciji sa fermentabilnošću skroba ($r^2 = 0,42$). Određivanje koeficijenta korelacije između prinosa etanola i prinosa izdvojenog skroba ispitivanih ZP hibrida konstatovano je da pozitivna korelaciona povezanost između ove dve promenljive nije statistički značajna ($r = 0,38$, $r^2 = 0,14$). Pruiett (2002.,

neobjavljeni podaci) je na ispitivanih 18 hibrida primenio postupak mokrog mlevenja i skraćenog suvog mlevenja kojima je utvrdio ukupnu koncentraciju glukoze; ovi podaci su upoređeni sa ukupnim prinosom izolovanog skroba. Glukoza i istaloženi skrob nisu bili u statistički značajnoj korelaciji ($r^2 = 0,05$). Singh i Graeber (2005) su utvrdili prinose etanola i izdvojenog skroba za 18 hibrida koji su gajeni na četiri različite lokacije. Oni su objavili da nema statistički značajne korelacije između konačnog prinosa etanola i izdvojenog skroba ($r^2 = 0,0038$) niti između konačnog prinosa etanola i ukupnog sadržaja skroba ($r^2 = 0,0001$). Haefele i saradnici (2004) su sprovedli laboratorijsko ispitivanje 26 hibrida različite genetičke osnove. Merili su potencijalni prinos etanola u vidu potrošnje ugljen-dioksida po jedinici mase čestica kukuruznog brašna i zaključili da je korelacija između ukupnog sadržaja skroba i prinosa etanola veoma značajna ($r^2 = 0,62$).

6.5. ENERGETSKI I EKONOMSKI ASPEKTI PROIZVODNJE ETANOLA IZ HIBRIDA KUKURUZA

Energetska vrednost goriva predstavlja jedan od bitnih faktora koje treba imati u vidu prilikom projektovanja procesa proizvodnje. Količina energije određenog goriva usko je povezana i sa formiranjem njegove cene na tržištu.

U ovom odeljku izračunate su energetske vrednosti bioetanola koji se može dobiti iz kilograma kukuruza, odnosno energije sagorevanja izražene u MJ. Zatim su određene energetske vrednosti celog zrna, pojedinih komponenata zrna, kukuruznog oklaska (koćanke) i sporednog proizvoda procesa dobijanja bioetanola – suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama.

U literaturi se može pronaći podatak da energija sagorevanja 1 mol-a etanola iznosi 1367 kJ (Huang i Zhang, 2011) dok Patzek (2004) navodi podatak 1363,9 MJ kmol⁻¹. Ako je molarna masa etanola 46,07 g mol⁻¹ može se izračunati energija sagorevanja etanola po kilogramu koja se poklapa sa podatkom koji je objavio Patzeka (2007) i iznosi 29,7 MJ kg⁻¹, odnosno 23,4 MJ l⁻¹. U poređenju sa bioetanolom običan benzin sadrži energiju od 34,8 MJ l⁻¹ odnosno 44,4 MJ kg⁻¹. Sa dijagrama koji je prikazan na slici 5.6. (poglavlje 5.2.14) koja prikazuje odnos energije sagorevanja etanola pre i posle prečišćavanja može se očitati podatak da se energija nakon prečišćavanja za prinos etanola od 5,5% (w/w) smanjuje za čak 22%, a za prinos etanola od 8,5% (w/w) oko 17%.

U tabeli 6.29. prikazani su rezultai proračuna energija sagorevanja količine etanola dobijene po kilogramu kukuruza u SSF procesu nakon 24 i 48h fermentacije i adekvatne količine energije prečišćenog etanola “fuel grade” čistoće. Uslovi procesa su kao u tabelama 6.15 i 6.16.

Tabela 6.29. Energija sagorevanja količine etanola dobijene po kilogramu kukuruza u SSF procesu nakon 24 i 48h fermentacije i adekvatne količine energije prečišćenog etanola “fuel grade” čistoće. Uslovi procesa su kao u tabelama 6.15 i 6.16.

Genotip	24h fermentacije		48h fermentacije	
	Energija sagorevanja dobijene količine etanola, MJ	Energija sagorevanja prečišćenog etanola, MJ	Energija sagorevanja dobijene količine etanola, MJ	Energija sagorevanja prečišćenog etanola 48h, MJ
ZP 172/8	6,17	3,76	8,77	7,28
ZP 243	5,67	3,46	8,93	7,41
ZP 341	6,27	3,83	8,35	6,93
ZP 362	5,69	3,47	8,74	7,25
ZP 377	5,96	3,64	9,08	7,54
ZP 434	6,39	3,90	9,43	7,82
ZP 444	5,75	3,51	8,64	7,17
ZP 484	5,71	3,48	8,14	6,76
ZP 505	5,66	3,45	8,46	7,02
ZP 548	6,24	3,81	9,47	7,86
ZP 560	5,66	3,45	8,52	7,07
ZP 574/8	5,44	3,32	8,40	6,97
ZP 600	5,59	3,41	8,60	7,14
ZP 606	5,50	3,36	8,78	7,29
ZP 611k	5,69	3,47	7,87	6,53
ZP 620b	5,86	3,58	8,56	7,11
ZP 633	6,29	3,84	8,59	7,13
ZP 666	6,07	3,70	9,00	7,47
ZP 677	5,70	3,48	8,88	7,37
ZP 704wx	5,50	3,36	8,55	7,10
ZP 74b	5,49	3,35	8,60	7,14
ZP 747	5,45	3,32	9,05	7,51
ZP 749	5,41	3,30	8,75	7,27
ZP 789	6,04	3,69	8,77	7,28
ZP 808	5,60	3,41	8,93	7,41
ZP 877	5,84	3,56	8,85	7,35
ZP Rumenska	5,29	3,23	7,88	6,54
Minimum	5,29	3,23	7,87	6,53
Maximum	6,39	3,90	9,47	7,86
Prosek	5,78	3,52	8,69	7,21

Iz podataka prikazanih u tabeli 6.29. se može zaključiti da je nakon 24h fermentacije energetski najefikasniji hibrid ZP 434 (6,39 MJ) odnosno da je energetski najmanje efikasan hibrid ZP Rumenka (5,29 MJ). Nakon 48h fermentacije energetski je bio najefikasniji hibrid ZP 548 (9,47 MJ), a za njim slede hibridi ZP 434 (9,43 MJ) i ZP 377 (9,08 MJ), dok se kao najmanje efikasan pokazao se hibrid ZP 611k (7,87 MJ). Etanol se nakon fermentacije mora izdvojiti iz fermentacione podloge postupcima destilacije i rektifikacije kako bi se dobio anhidrovani etanol koji sadrži minimalno 99,5% etanola i zadovoljava standarde kvaliteta motornog goriva (Mojović i sar., 2007). Povećanjem koncentracije etanola značajno se smanjuju troškovi njegove separacije, posebno ako je koncentracija niža od kritične koja iznosi 4% (w/w). Kada je koncentracija etanola niža od kritične, izdvajanje etanola standardnim postupkom destilacije nije ekonomično. Za separaciju četvoropostotnog etanola potrebno je utrošiti 35% njegove energije sagorevanja (Huang i Zhang, 2011). Kao što se sa dijagrama prikazanog na slici 5.6 (poglavlje 5.2.14) može zaključiti, energetska efikasnost etanola se značajno povećava sa porastom procenta prinosa etanola ostvarenog fermentacijom, jer je i smanjenje energije nakon procesa prečišćavanja manje. Iz navedenog razloga se može zaključiti da je ekonomski isplativije produženje procesa fermentacije u cilju postizanja što višeg prinosa etanola.

Tabela 6.30. Energija sagorevanja pojedinih hemijskih komponenata zrna hibrida kukuruza i aproksimirana energija sagorevanja celog zrna po kilogramu kukuruza

Genotip	Energija ukupnog skroba, MJ	Energija izolovanog skroba, MJ	Energija ulja, MJ	Energija celuloze, MJ	Energija proteina, MJ	Aproksimirana energija celog zrna, MJ
ZP 172/8	11,54	10,32	2,55	0,32	2,05	16,46
ZP 243	11,48	10,26	2,19	0,31	2,03	16,00
ZP 341	10,89	9,73	2,18	0,36	2,08	15,51
ZP 362	11,46	10,24	2,10	0,34	1,97	15,86
ZP 377	11,13	9,95	2,18	0,35	2,10	15,76
ZP 434	11,19	10,00	2,10	0,37	2,18	15,85
ZP 444	11,18	9,99	2,28	0,35	2,01	15,82
ZP 484	10,93	9,77	2,58	0,38	2,18	16,07
ZP 505	11,46	10,24	2,24	0,34	2,13	16,17
ZP 548	11,42	10,20	2,17	0,31	2,01	15,90
ZP 560	11,26	10,06	2,02	0,40	2,07	15,75
ZP 574/8	10,97	9,81	1,63	0,36	2,26	15,22
ZP 600	11,35	10,14	1,73	0,37	2,14	15,59
ZP 606	11,22	10,02	1,88	0,32	2,16	15,58
ZP 611k	10,99	9,83	1,93	0,41	2,93	16,27
ZP 620b	11,33	10,13	1,99	0,35	2,05	15,72
ZP 633	11,43	10,21	2,21	0,34	2,11	16,09
ZP 666	11,47	10,25	1,93	0,38	2,01	15,78
ZP 677	11,58	10,35	1,74	0,38	1,94	15,65
ZP 704wx	11,61	10,38	2,01	0,35	2,23	16,20
ZP 74b	11,41	10,20	2,01	0,41	1,92	15,75
ZP 747	11,31	10,11	2,46	0,36	1,96	16,10
ZP 749	11,21	10,02	1,89	0,32	2,13	15,55
ZP 789	11,32	10,12	1,90	0,36	2,11	15,70
ZP 808	11,54	10,32	1,82	0,36	1,89	15,62
ZP 877	11,61	10,38	1,84	0,34	2,10	15,89
ZP Rumenska	10,50	9,38	2,56	0,35	2,56	15,97
Minimum	10,50	9,38	1,63	0,31	1,89	15,22
Maximum	11,61	10,38	2,58	0,41	2,93	16,46
Prosek	11,29	10,09	2,08	0,36	2,12	15,85

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.30. se može videti da je energija sagorevanja ukupnog skroba zrna kukuruza veoma visoka i kreće se u rasponu od 10,50 (ZP Rumenska) do 11,61 MJ (ZP 877) za ukupnu količinu skroba u jednom kilogramu kukuruza. Koristeći podatak da je prosečno iskorišćenje skroba u laboratorijskom postupku izdvajanja skroba 89,38%, dolazi se do vrednosti energije izdvojenog skroba koja je u proseku za 1,20 MJ manja od vrednosti za ukupan skrob zrna kukuruza. Aproksimirana energija celog zrna izračunata kao zbir energija komponenata zrna je u skladu je sa vrednostima koje su objavili Berruto i saradnici (2010). Ovi istraživači su, naime, sagorevanjem samlevenog kukuruznog zrna (sadržaja vlage 13%) u specijalnom uređaju sa fluidizovanim slojem i direktnim plamenom dobili energetska vrednost od 15,88 MJ kg⁻¹, koja je veoma slična izračunatim vrednostima energija u ovom radu ispitivanih hibrida.

U tabeli 6.31. prikazani su rezultati proračuna energija sagorevanja koćanke kao i aproksimirana ukupna energija sagorevanja suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama (48h fermentacije) kao sporednog proizvoda procesa fermentacije skroba iz brašna celog zrna dobijenog iz jednog kilograma merkantilnog kukuruza.

Tabela 6.31. Energija sagorevanja koćanke i aproksimirana ukupna energija sagorevanja suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama (48h fermentacije) kao sporednog proizvoda procesa fermentacije skroba iz brašna 1 kg zrna kukuruza

Genotip	Energija sagorevanja koćanke, MJ	Aproksimirana energija džibre po kilogramu kukuruza, MJ
ZP 172/8	3,69	4,92
ZP 243	3,56	4,52
ZP 341	3,23	4,62
ZP 362	3,61	4,40
ZP 377	3,25	4,63
ZP 434	3,19	4,65
ZP 444	3,44	4,64
ZP 484	3,33	5,15
ZP 505	3,21	4,71
ZP 548	3,44	4,49
ZP 560	3,12	4,49
ZP 574/8	3,74	4,25
ZP 600	3,43	4,25
ZP 606	3,18	4,37
ZP 611k	4,27	5,27
ZP 620b	4,03	4,39
ZP 633	3,00	4,66
ZP 666	2,78	4,31
ZP 677	3,68	4,07
ZP 704wx	3,02	4,59
ZP 74b	4,63	4,34
ZP 747	3,45	4,79
ZP 749	4,16	4,35
ZP 789	3,27	4,37
ZP 808	3,58	4,07
ZP 877	3,30	4,28
ZP Rumenka	4,35	5,47
Minimum	2,78	4,72
Maximum	4,63	4,85
Prosek	3,52	4,56

Pretpostavka je da u idealnom slučaju suva materija ukupne džibre predstavlja ostatak suve materije celog zrna (bez skroba). Iz tog razloga je aproksimirana energija kukuruzne džibre dobijene iz kilograma kukuruza izračunata kao razlika ukupne energije celog zrna i energije skroba, zbog toga što je tokom fermentacije utrošeno oko 99% skroba na proizvodnju etanola i ćelijske mase kvasca. Kada se energija suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama preračuna na MJ kg^{-1} suve materije, dobija se vrednost od $18,93 \text{ MJ kg}^{-1}$. Prosečna energija suve kukuruzne džibre, izračunata kao ukupna energija hraniva, iznosi $5434 \text{ kcal kg}^{-1}$, odnosno $22,73 \text{ MJ kg}^{-1}$ (računato na suhu materiju) (Pedersen i sar., 2007), što ukazuje da su aproksimirane vrednosti prikazane tabeli 6.30 za $3,8 \text{ MJ kg}^{-1}$ niže od realnih. To se može objasniti činjenicom da se tokom fermentacije, u kojoj nastaje etanol a troše fermentabilni šećeri, povećava i ćelijska masa kvasca. Kvasac ne sadrži proteolitičke enzime kojima bi se razgradili proteini kukuruza, te se iz tog razloga energija kukuruzne džibre obogaćuje energijom proteina koji ulaze u sastav ovog mikroorganizma i čine veći deo njegove ćelijske mase. Deo energije sagorevanja džibre, prema tome, potiče i od kvasca.

Iz podataka prikazanih u tabeli 6.31. vidi se da se energetska vrednost koja se dobija sagorevanjem koćanke kreće se od 2,78 do 4,63 MJ, što je manje od najniže izračunate energije suve kukuruzne džibre sa rastvorenim materijama.

U svom radu Pimentel (2003) iznosi podatak da se po hektaru gajenog kukuruza utroši 35,73 GJ ($33,872 \cdot 10^6 \text{ BTU}$) energije. Ako prosečan prinos kukuruza po hektaru iznosi 8,5 tona zrna, onda je ukupna energija proizvedenog kukuruza 130,50 GJ ($123,696 \cdot 10^6 \text{ BTU}$) što znači da je odnos uložene i dobijene energije 1:3,65.

Mousdale (2008) navodi podatke da proizvodnja 1GJ etanola iz skrobnih ili šećernih sirovina u Evropskoj uniji i SAD košta između 16,2-23 € odnosno 0,29-0,41 € l^{-1} . To znači da se za proizvodnju jednog litra etanola utroši 17,82-17,90 MJ, odnosno oko 5,5 MJ manje energije od energetske vrednosti jednog litra etanola.

Prosečni troškovi proizvodnje kukuruza po hektaru, zasnovani na cenama pojedinih predsetvenih i setvenih operacija uključujući berbu, transport, cene goriva, đubriva i herbicida, prikazani su u tabeli 6.32. Proračun je vršen za uslove na lokaciji Zemun Polje i gajenje ZP hibrida kukuruza. Uzeto je u obzir da je tip zemljišta na ovoj lokaciji černo zem, a da je predusev bio pšenica.

Tabela 6.32. Prosečni troškovi proizvodnje kukuruza po hektaru obradivog zemljišta

Operacija	Cena goriva utrošenog po operaciji, din ha ⁻¹	Ukupna cena operacije, din ha ⁻¹	Cena potrebne količine đubriva ili herbicida, din ha ⁻¹
Oranje do 15 cm (ugarenje)	2350,40	651,00	
Rasturanje mineralnog đubriva pre oranja (osnovno đubrenje)	440,70	113,33	15.680,00
Oranje do 25 cm	3525,60	1389,71	
Rasturanje mineralnog đubriva posle oranja (predsetveno đubrenje)	440,70	124,67	7000,00
Predsetvena priprema zemljišta (drljanje)	587,60	147,00	
Setva kukuruza (mehaničko sejanje)	587,60	231,11	
Navodnjavanje		16.800,00	
Tretiranje zemljišta herbicidom	440,70	80,14	4000,00
Korektivno prskanje herbicidom	440,70	150,00	4695,00
Kombajniranje kukuruza u zrnu	4113,20	1895	
Transport do skladišta	293,80	94,29	
Ukupno	13.221,00	21.676,25	31375,00
Ukupni troškovi proizvodnje, din ha⁻¹	66.272,25 (591,70 € ha⁻¹)		

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 6.32. može se zaključiti da ukupni troškovi proizvodnje merkantilnog kukuruza po jednom hektaru obradive površine iznose nešto više od 66.000 dinara, odnosno oko 590 €.

Cena proizvodnje po kilogramu kukuruznog zrna, bruto i neto prihodi od prodaje merkantilnog kukuruza dobijenog po hektaru obrađenog zemljišta, za cenu kilograma merkantilnog kukuruza roda 2012. godine koja je iznosila 27 dinara, prikazani su u tabeli 6.33.

Tabela 6.33. Prihodi od prodaje merkantilnog kukuruza dobijenog po hektaru zasejane površine za prosečan prinos u periodu 2009-2012. godine

Hibrid	Prosečan prinos, kg ha ^{-1*}	Cena proizvodnje, din kg ⁻¹	Bruto prihod po hektaru, din	Neto prihod po hektaru, din	Neto prihod, din kg ⁻¹
ZP 434	10.652	6,22	287.604	221.332	20,78
ZP 606	11.656	5,69	314.712	248.440	21,31
ZP 666	12.478	5,31	336.906	270.634	21,69
Hibrid	Prosečan prinos, kg ha ⁻¹	Cena proizvodnje, € kg ⁻¹	Bruto prihod po hektaru, €	Neto prihod po hektaru, €	Neto prihod, € kg ⁻¹
ZP 434	10.652	0,055	2568	1976	0,186
ZP 606	11.656	0,051	2810	2218	0,190
ZP 666	12.478	0,047	3008	2416	0,194

*Prinosi kukuruznog zrna po hektaru ponderisani su na 14% vlage zrna.

Iz rezultata proračuna prikazanih u tabeli 6.33. uočava se da se cena proizvodnje po kilogramu merkantilnog kukuruza kreće od 5,31-6,22 dinara, odnosno da neto prihod po kilogramu merkantilnog kukuruza iznosi 20,78-21,69 dinara. Po hektaru se najveći

neto prihod od prodaje merkantilnog kukuruza ostvaruje za hibrid ZP 666 (270.634 din) zbog najvećeg prosečnog prinosa ovog hibrida.

U tabeli 6.34. prikazana je struktura troškova proizvodnje bioetanola, mogući prihodi od sporednih proizvoda i mogući prihodi od prodaje ovog goriva.

Tabela 6.34. Struktura troškova proizvodnje bioetanola

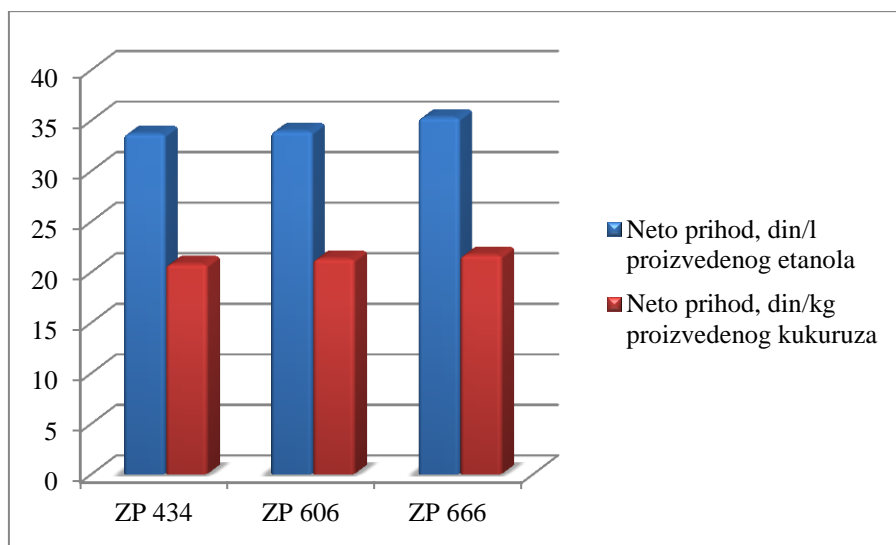
Komponenta troška	Prosečna cena, din l ⁻¹		
	ZP 434	ZP 606	ZP 666
Cena sirovine	15,43	15,17	13,81
<i>Prihodi od sporednih proizvoda</i>			
Suva kukuruzna džibra	4,74		
Ugljen-dioksid	0,15		
Neto troškovi sirovine	10,54	10,28	8,92
<i>Operativni troškovi</i>			
Električna energija	1,27		
Gorivo	4,61		
Upravljenje otpadom	0,15		
Voda	0,074		
Enzimi	0,91		
Kvasac (proizvodni mikroorganizam)	0,11		
Hemikalije	0,78		
Denaturant	1,18		
Održavanje	1,35		
Radna snaga	1,27		
Administrativni troškovi	0,92		
Ostalo	0,10		
Ukupno	12,72		
Ukupni troškovi proizvodnje etanola i sirovine	ZP 434	ZP 606	ZP 666
	23,26	23,00	21,64
Prinos etanola po hektaru, l	3541,84	3978,75	4145,43
Cena proizvodnje etanola po hektaru, din	82.383,12	91.511,31	89.707
Cena proizvodnje etanola po hektaru, €	735,56	817,06	800,95
Neto prihod po litru, din	33,67	33,93	35,29
Neto prihod po hektaru, din	119.253,7	134.999,0	146.292,2
Neto prihod po hektaru, €	1064,76	1205,35	1306,18

U proračunima je uzeto da je 1€ = 112 dinara i cena etanola iz jula 2012. godine koja je u SAD iznosila 2,60 \$ gal⁻¹ = 0,51 € l⁻¹ = 56,93 din l⁻¹ (ICIS, 2012).

Iz podataka prikazanih u tabeli 6.34. može se zaključiti da se neto prihod po litru proizvedenog bioetanola kreće od 33,67 do 35,29 dinara, kao i da su po hektaru neto prihodi 119-146 hiljada dinara. Iz tabele se vidi podatak da cena sporednog proizvoda fermentacije bioetanola – suva kukuruzna džibra sa rastvorenim materijama iznosi 4,74

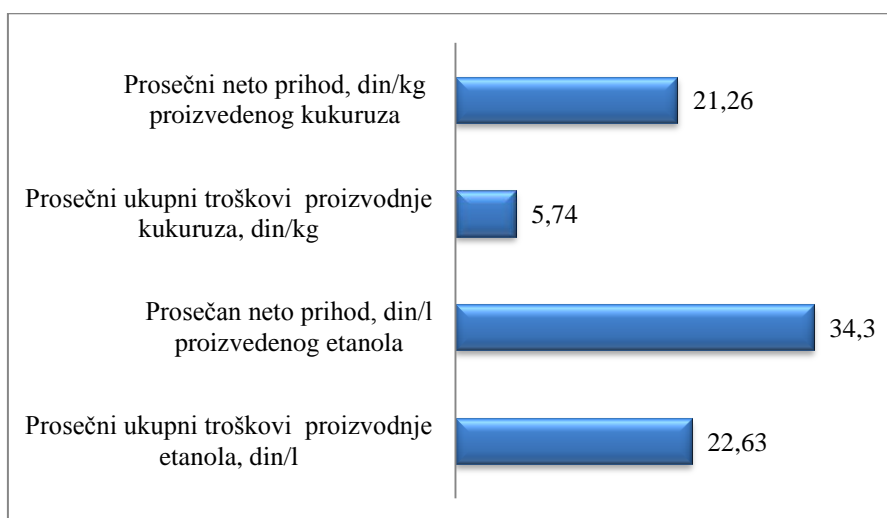
din l⁻¹ etanola, odnosno da računato na ukupni prihod od prodaje litra ovog goriva predstavlja oko 14%.

Na slici 6.15. prikazan je odnos neto prihoda po litru proizvedenog bioetanola i po kilogramu proizvedenog kukuruza za tri odabrana hibrida.



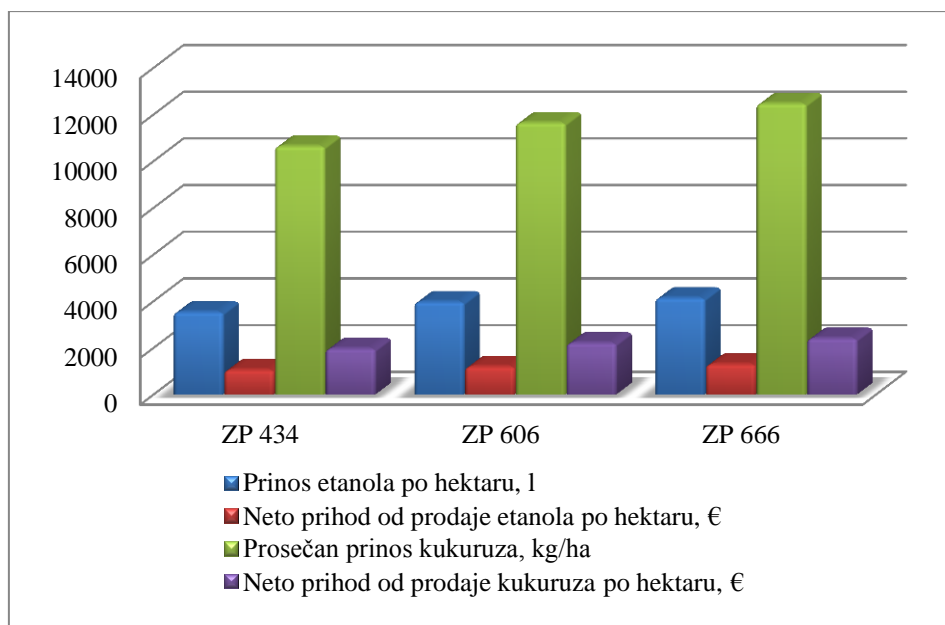
Slika 6.15. Odnos neto prihoda po litru proizvedenog etanola i kilogramu kukuruza

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 6.15. se može zaključiti da su prihodi po litru proizvedenog etanola viši od prihoda po kilogramu proizvedenog merkantilnog kukuruza za sva tri hibrida, a najviši za hibrid ZP 666. Uporedni prikaz prosečnih troškova proizvodnje i neto prihoda po kilogramu proizvedenog kukuruza odnosno litru etanola dat je na slici 6.16.



Slika 6.16. Prosečni neto prihodi i troškovi proizvodnje kukuruza i etanola

Na slici 6.17. dat je uporedni prikaz prinosa i neto prihoda od proizvodnje kukuruza i etanola odabranih hibrida po hektaru obradive površine.



Slika 6.17. Prinosi i neto prihodi proizvodnje kukuruza i etanola odabranih hibrida po hektaru

Sa slike 6.17. i iz tabela 6.32. i 6.33. može se zaključiti da se prodajom jednog litra etanola ostvaruje veći profit nego prodajom kilograma kukuruza, ali da je po jednom hektaru veća isplativost od prodaje merkantilnog kukuruza. To se može objasniti činjenicom da je za proizvodnju jednog litra etanola potrebno u proseku 2,5 kg kukuruza.

U realnim uslovima ne može se očekivati da se sav kukuruz, namenjen prvenstveno ishrani ljudi i životinja, koristi za proizvodnju biogoriva. Dobijeni rezultati ukazuju da je proizvodnja određene količine bioetanola od kukuruznog zrna isplativa, te da je potrebno projektovati proizvodnju tako da se nađe adekvatna mera između potreba prehrambene i industrije alternativnih goriva. Uzimajući u obzir činjenicu da je Srbija jedan od potpisnika Kjoto sporazuma (1997) koji se odnosi na smanjenje emisije gasova koji doprinose efektu staklene bašte kao i da su u Akcionom planu o biomasi (2010) ustanovljeni kriterijumi održivosti za biogoriva i tečna biogoriva, početak proizvodnje bar i minimalnih količina bioetanola predstavljao bi značajan korak prema ostvarenju ovih ciljeva.

ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazanih u ovom rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ispitani hibridi kukuruza razlikuju se po svojim fizičkim karakteristikama i hemijskom sastavu zrna što pruža velike mogućnosti i predstavlja osnovu raznovrsnosti njihove prerade i primene.

2. Za ispitivane hibride utvrđeni su različiti stepeni fermentabilnosti određeni na osnovu prinosa bioetanola u procesu fermentacije. Hibridi standardnog hemijskog sastava žutog zrna, zubani, pokazali su bolje fermentativne karakteristike od hibrida specifičnih svojstava kao što su kokičari, voskovci, hibridi belog i crvenog zrna.

3. Najviši prinosi bioetanola ostvaruju se postupkom simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) sa mešanjem, a neznatno niži postupkom odvojene hidrolize i fermentacije (SHF) brašna celog zrna odabranih hibrida kukuruza. Procesom simultane hidrolize i fermentacije postiže se početno skraćanje procesa za četiri sata koliko traje saharifikacija u SHF procesu. Treba takođe uzeti u obzir da se proces simultane hidrolize i fermentacije odvija na temperaturi od 30°C, što je znatno niža temperatura od one koja je neophodna za saharifikaciju (55°C), te se tako postiže značajna ušteda energije i povećava efikasnost proizvodnje etanola. Utvrđeno optimalno vreme trajanja procesa SHF sa procesom hidrolize iznosilo je 45h, dok je za proces SSF sa mešanjem i bez mešanja uključujući fazu utečnjavanja skroba bilo 33h odnosno 37h.

4. Hibrid ZP 434 dao je najviši prinos bioetanola koji je iznosio 94,5% od teorijskog sadržaja bioetanola u procesu odvojene hidrolize i fermentacije (SHF). Visoki prinos bioetanola ovog hibrida pripisan je visokom sadržaju skroba u njegovom zrnju kao i visokom udelu meke frakcije endosperma koji je podložniji delovanju enzima koji hidrolizuju skrob i razlažu skrobne granule tokom hidrolize. Zbog svoje visoke rodosti, odnosno prinosa po hektaru, hibrid ZP 434 za gajanje zahteva manje obradive površine, tolerantan je na sušu, otporan na poleganje, daje dobre prinose i u skromnijim uslovima gajenja kao i na nadmorskoj visini do 600 metara. Sve navedene karakteristike čine hibrid ZP 434 veoma perspektivnom sirovinom za proizvodnju bioetanola.

5. Utvrđeno je da postoji veoma značajna pozitivna korelacija između procenta od teorijskog sadržaja etanola i udela meke frakcije endosperma ($r = 0,82$), kao i između prinosa etanola po gramu polaznog supstrata i udela meke frakcije endosperma zrna kukuruza ($r = 0,82$). Uočena je veoma značajna korelacija između sadržaja etanola i

sadržaja skroba u zrnu ($r = 0,71$). Koeficijenti korelacije su pokazali da ne postoje statistički značajne veze između prinosa etanola i sadržaja ulja i celuloze.

6. Koeficijent korelacije izračunat između procenta od teorijskog sadržaja etanola i svarljivosti skroba ($r = 0,78$) ukazuje da postoji veoma značajna statistička veza između ova dva parametra. S obzirom na značaj hidrolitičke razgradnje skroba do fermentabilnih šećera za što efikasniji proces alkoholnog vrenja ovakva vrednost korelacije je i bila očekivana. Određivanjem koeficijenta korelacije između prinosa etanola i prinosa izolovanog skroba ispitanih hibrida ($r = 0,38$) utvrđeno je da korelacija između ove dve promeljive nije statistički značajna.

7. Prinos bioetanola uslovljen je ne samo sadržajem skroba u zrnu kukuruza, već i drugim parametrima kao što je udeo meke odnosno tvrde frakcije endosperma, stepen razgradljivosti odnosno svarljivosti skroba, sadržaj proteina i drugim činiocima kao što su optimalna temperatura odvijanja fermentacije, pH vrednost, doza enzima, količina inokuluma proizvodnog mikroorganizma i vreme trajanja procesa. Fizičke karakteristike i hemijski sastav zrna kukuruza utiču kako na samu kinetiku proizvodnje tako i na konačan prinos bioetanola. Zbog toga je potrebno sprovesti detaljnija istraživanja u cilju utvrđivanja preciznog modela po kome bi se mogao predvideti tačan prinos ovog alkohola iz zrna kukuruza.

8. Svi uzorci džibre ispitanih hibrida pokazali su povoljne karakteristike koje se tiču fizičkih svojstava, hemijskog sastava, prisustva mineralnih materija, sadržaja svarljive i metaboličke energije kao i procenta svarljivosti suve materije. Sadržaj svarljive energije u uzorcima suve kukuruzne džibre ispitivanih ZP hibrida kukuruza kretao se od $16,36 \text{ MJ kg}^{-1}$ (ZP 74b) do $17,25 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ZP 611k) a metaboličke energije od $15,83 \text{ MJ kg}^{-1}$ (ZP 434) do $16,18 \text{ MJ kg}^{-1}$ (ZP 74b). Visok sadržaj kako svarljive tako i metaboličke energije ispitanih uzoraka ukazuje da ove džibre spadaju u grupu kako proteinskih tako i visokoenergetskih hraniva. Udeo proteina u suvoj kukuruznoj džibri je više nego udvostručen u odnosu na zrno kukuruza kao polaznu sirovinu. Ova pojava se objašnjava činjenicom da se sadržaj skroba u džibri značajno smanjio tokom procesa fermentacije, te se udeo proteina u odnosu na suhu materiju povećao. Takođe, jedan deo proteina potiče od ćelijske mase proizvodnog mikroorganizma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Povećan sadržaj NDF-a i ADF-a – lignoceluloznih (dijetetskih) vlakana u kukuruznoj džibri u odnosu na zrno kukuruza i njeno korišćenje u ishrani dovodi do poboljšanja stanja u rumenu (buragu) preživara. Kvalitet suve kukuruzne džibre je promenljiv i zavisi od hibrida kukuruza korišćenog u fermentaciji

kao i od brojnih parametara procesa proizvodnje bioetanola. Zbog toga se kvalitet mora redovno kontrolisati i biti u skladu sa propisima Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje za ovo hranivo. Kvalitetna suva kukuruzna džibra može se koristiti za pripremu potpunih i koncentrovanih smeša za ishranu različitih vrsta i kategorija domaćih životinja. Korišćenjem suve džibre sa rastvorenim materijama za ishranu životinja u Srbiji bi se mogao ostvariti prihod u iznosu od 14% od ukupnog prihoda iz proizvodnje bioetanola. Suva kukuruzna džibra sa rastvorenim materijama kao sporedni proizvod industrije bioetanola na bazi žita mogla bi pozitivno uticati na razvoj produkcije bioetanola tako što bi se koristila u ishrani domaćih životinja kao komponenta smeša u procentu većem nego što je do sada bilo praktikovano u svetu i kod nas.

9. U laboratorijskoj simulaciji procesa mokrog mlevenja kukuruza najveće iskorišćenje skroba (94,15%) ispoljio je hibrid ZP 341, a najmanje iskorišćenje hibrid ZP 243 (83,86%). Sadržaj proteina u izolovanom skrobu se kretao od 0,16 do 0,27 što ukazuje na dobar kvalitet dobijenih skrobova. Kod hibrida standardnog hemijskog sastava utvrđeno je da se sadržaj amiloze kretao od 23,2 do 25,1% a amilopektina od 74,9 do 76,8%. Izolovani srob voštanog hibrida ZP 704 wx, sadržao je 1% amiloze. Koeficijent korelacije između svarljivosti skroba i udela amilopektinske frakcije u molekulu skroba iznosio je $r = 0,70$, što ukazuje da postoji visokoznačajna pozitivna korelacija između ova dva parametra. Koeficijenti korelacije između prinosa skroba i sadržaja skroba u zrnu ($r = 0,50$), odnosno između prinosa skroba i iskorišćenja skroba ($r = 0,51$), ukazuju da postoji značajna korelaciona veza između ovih parametara. Između procenta od teorijskog prinosa etanola i svarljivosti skroba izračunat je koeficijent korelacije od 0,78, što ukazuje da postoji veoma značajna korelacija između ove dve promeljive.

10. Energetske vrednosti bioetanola dobijenog po kilogramu kukuruza variraju između 7,87 i 9,47 MJ pre prečišćavanja do stepena čistoće koji je propisan standardima o sastavu goriva (minimalno 99,5% etanola). Prečišćavanjem se gubi oko 17% početne energije goriva, kada je prinos etanola oko 8,5% (w/w). Energetska vrednost ukupnog skroba zrna kukuruza je relativno visoka i kreće se u rasponu od 10,50 do 11,61 MJ odnosno 9,38 do 10,38 MJ za skrob istaložen u postupku mokre meljave kukuruza.

11. Prodajom jednog litra etanola mogao bi se ostvariti veći profit nego prodajom kilograma kukuruza. S obzirom da je za proizvodnju jednog litra etanola u proseku potrebno 2,5 kg kukuruza, proračunom se dolazi do zaključka da je po hektaru obradive površine veća isplativost od prodaje merkantilnog kukuruza. U realnom

slučaju nije ni za očekivati da se sav kukuruz, namenjen prvenstveno ishrani ljudi i životinja, koristi za proizvodnju biogoriva. Dobijeni rezultati ukazuju da je proizvodnja određenog procenta bioetanola od zrna kukuruza u Srbiji isplativa, te da je potrebno projektovati proizvodnju tako da se nađe adekvatna mera između potreba prehrambene i industrije alternativnih goriva. S obzirom da je Srbija jedan od potpisnika Kjoto sporazuma (1997) koji se odnosi na smanjenje emisije gasova koji doprinose efektu staklene bašte kao i da su u Akcionom planu o biomasi (2010) ustanovljeni kriterijumi održivosti za biogoriva i tečna biogoriva, početak proizvodnje bar i minimalnih količina bioetanola predstavljao bi značajan korak prema ostvarenju ovih ciljeva.

12. Rezultati istraživanja sprovedenog na domaćim ZP hibridima, prikazani u ovoj disertaciji, afirmišu kukuruz kao obnovljivu sirovinu sa aspekta proizvodnje alternativnog goriva – bioetanola. Iskorišćenje sirovine je u ovom slučaju potpuno jer osim glavnog proizvoda, bioetanola, vredan sporedni proizvod, suva kukuruzna džibra, nalazi svoju primenu u ishrani domaćih životinja. To ukazuje na veliki potencijal ovog za Srbiju izuzetno važnog žita koji treba putem pažljivo isprojektovanog sistema proizvodnje i primene u najskorijoj budućnosti iskoristiti.

LITERATURA

1. AFNOR. 1993. Agricultural food products, Determination of crude fibre. General method NF-V03-040 (Status: certified standard ref. ISO 5498). Ass. Fr. De Normalisation, Paris, France.
2. Alternative Fuels Data Center - AFDC. 2013. Fuel Properties Comparison. [Online]: http://www.afdc.energy.gov/fuels/fuel_comparison_chart.pdf (06.03.2013)
3. Agriculture corner. 2010. Ethanol Seen Driving Up Food Prices, [Online]: <http://www.agricorner.com/ethanol-seen-driving-up-food-prices/>(05.07.2012)
4. Agrostats, World corn production, consumption and stocks, 2012. [Online]: <http://www.agrostats.com/world-statistic/world-corn.html> (05.07.2012)
5. Agu R.C., Swanston J.S., Walker J.W., Pearson S.Y., Bringham T.A., Brosnan J.M., *et al.* 2009. Predicting alcohol yield from UK soft winter wheat for grain distilling: combined influence of hardness and nitrogen measurements. *Journal of the Institute of Brewing* 115:183–190.
6. Aier P.V. 2005. Amylases and their applications. Review. *African Journal of Biotechnology* 4:1524-1529.
7. Akay V., Jackson J.R., Jr. 2001. Effects of NutriDense and waxy corn hybrids on the rumen fermentation, digestibility and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84:1698-1706.
8. Akcioni plan za biomasu 2010-2012, Srpsko – holandski projekat na nivou vlada o biomasi i biogorivima (G2G08/SB/6/3), Vlada Republike Srbije, Ministarstvo rudarstva i energetike, Beograd, 2010. [Online]: http://www.psemr.vojvodina.gov.rs/attachments/203_BAPsrpski.pdf (03.03.2013)
9. Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillonet S.E., Uribe Larrea J.L., Goma G., Benbadis L. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during feed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:67-72.
10. Altay F., Gunasekaran S. 2006. Influence of drying temperature, water content, and heating rate on gelatinization of corn starches. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54:4235–4245.
11. Apar D.K., Özbek B. 2004. α -amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. *Process Biochemistry* 39:1877-1892.

12. Arasaratnam V., Balasubramaniam K. 1993. Synergistic action of alpha-amylase and glucoamylase on raw corn. *Starch-Stärke* 45:231-233.
13. Asaoka M., Okuno K., Konishi Y., Fuwa H. 1987. The effects of endosperm mutations and environmental temperature during development on the distribution of molecular weight of amylose in rice endosperms. *Agricultural and Biological Chemistry* 51:3451- 3453.
14. Asaoka M., Okuno K., Fuwa H. 1985. Effect of environmental temperature at the milky stage on amylose content and fine structure of amylopectin of waxy and nonwaxy endosperm starches of rice (*Oryza sativa* L). *Agricultural and Biological Chemistry* 49:373-379.
15. Asaoka M., Okuno K., Sugimoto Y., Kawakami K., Fuwa, H. 1984. Effect of environmental temperature during development of rice plants on some properties of endosperm starch. *Starch/Stärke* 36:189-193.
16. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1990. Fiber (Acid Detergent) and Lignin in Animal Feed. (973.18) Official Methods of Analysis.. 15th Edition.
17. Au F., McKeown L., McAllister T.A., Chaves A.V. 2010. Fermentation characteristics of corn-, triticale-, and wheat-based dried distillers grains with solubles in barley-based diets determined using continuous and batch culture systems. *Journal of Science of Food and Agriculture* 90:2074-2082.
18. Au F., McKeown L.E., McAllister T.A., Chaves A.V. 2010. Fermentation characteristics of corn-, triticale-, and wheat-based dried distillers' grains with solubles in barley-based diets determined using continuous and batch culture systems. *Journal of Science of Food and Agriculture* 90:2074-2082.
19. Aufréré J., Demarquilly C. 1989. Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin-cellulase methods, in: Proceedings of the 16th International Grassland Congress, 4–11 October 1989, Nice, France, Association Française pour la Production Fourragère, Versailles Cedex, France, pp. 877–878.
20. Awole K.D., Kettlewell P.S., Hare M.C., Agu R.C., Brosnan J.M., Bringham T.A. 2012. Effect of environment and variety on the relationships of wheat grain physical and chemical characteristics with ethanol yield. *Journal of Science of Food and Agriculture* 92:577–584.
21. Badger P.C. 2002. Ethanol from cellulose: a general review, in: J. Janick, A. Whipkey (eds), *Trends in New Crops and New Uses*, ASHS Press, Alexandria, VA.

22. Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* 26:89-105.
23. Baier S., Clements M., Griffiths C., Ihrig J. 2009. Biofuels Impact on Crop and Food Prices: Using an Interactive Spreadsheet. [Online]: <http://www.federalreserve.gov/pubs/ifdp/2009/967/ifdp967.htm> (21.01.2013)
24. Baker R.W. 2000. Membrane Separation, Membrane Technology & Research Inc. (MTR) [Online]: <http://www.intechopen.com/books/advanced-technologies/new-advances-in-membrane-technology> (01.03.2013)
25. Baks T. 2007. Process development for gelatinisation and enzymatic hydrolysis of starch at high concentrations. Doktorska disertacija. Univerzitet u Wageningenu. Holandija. [Online]: <http://www.edepot.wur.nl/121909> (21.01.2013)
26. Balat M., Balat H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* 86:2273-2282.
27. Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballestros M. 2002. Enzymatic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry* 38:187–192.
28. Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., McHale A.P. 1998. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 63:258-266.
29. Baras J., Gaćeša S., Pejin D. Ethanol is a strategic raw material. 2002. *Hemijska industrija* 56:89-105.
30. Baras J., Gaćeša S., Jakovljević J., Marjanović N., Paunović R., Pejin D., Razmovski R. 1996. Stanje i mogućnosti razvoja proizvodnje i primene etanola u Jugoslaviji. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad.
31. Baras J., Kukić G., Šiler-Marinković S. 1992. Prehrambena tehnologija sa praktikumom, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
32. Baras J., Šušić S. 1982. Prehrambena tehnologija, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
33. Bayer E.A., Lamed R., Himmel M. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management, *Current Opinion in Biotechnology* 18:237-245.
34. Bayrock D.P., Ingledew W.M. 2004. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31:362-368.

35. Bebić Z., Jakovljević J., Baras J. Hidrolizati kukuruznog skroba kao fermentacioni supstrat za proizvodnju etanola. *Hemijska industrija* 54:5-9.
36. Beckman J. 2011. Feed demands and coproduct substitution in the biofuel era. *Agribusiness* 27(1):1-18.
37. Bekrić V. 1997. Upotreba kukuruza, Institut za kukuruz „Zemun Polje”, Beograd – Zemun.
38. Bekrić V. 1999. Industrijska proizvodnja stočne hrane: Savremena proizvodnja krmnih smeša, Institut za kukuruz „Zemun Polje”, Slobodana Bajića 1, Zemun – Beograd.
39. Belyea R.L., Rausch K.D., Tumbleson M.E. 2004. Composition of corn and distillers' dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. *Bioresource Technology* 94:293-298.
40. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Markov A., Skomarovsky A., Okunev O., Gusakov A., Maximenko V., Gregg D. 2005. Evaluation of novel fungal cellulase preparation for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes, *Enzyme Microbial Technology* 37:175-184.
41. Berruto R., Bechis S., Busato P. 2010. Combustion of corn grain in a direct burner for drying application. [Online]: <http://www.deiafa.unito.it/pdf/P451.pdf> (10.02.2013)
42. Bialas W., Szymanowska D., Grajek W. 2010. Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresource Technology* 101:3126–3131.
43. Birch R.M., Walker G.M. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 26:678-687.
44. Blanche S., Sun X. 2004. Physical characterization of starch extrudates as a function of melting transitions and extrusion conditions. *Advances in Polymer Technology* 23:277-290.
45. Boushey H. 1982. Asthma, sulfur dioxide and clean air act. *Western Journal of Medicine* 236:129-135.
46. Campbell M. R., Pollak L. M., White P. J. 1994. Effect of planting date on corn starch thermal properties. *Cereal Chemistry* 71: 556–559.
47. Cardona C.A., Sanchez O.J. 2007. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98:2415–2457.

48. Çaylak B., Sukan F.V. 1998. Comparison of different production processes for bioethanol. Turkish Journal of Chemistry 22:351-359.
49. Coordinating European Council - CEC 2006. Communication from the Commission: An EU Strategy for Biofuels, Brussels.
50. Christensen K., Smith A. 2008. The case for hemp as biofuel, Vote Hemp Inc. Report, Brattleboro, VT.
51. Claassen P.A.M., van Lier J.B., Lopez Contreras A.M., van Niel E.W.J. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology and Biotechnology 52:741-755.
52. Clark F.J. 2006. Ethanol growth inspires advances in cereal milling. Food Technology 60(9):73-75.
53. Conway T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and macular biology. FEMS Microbial Review 103:1-28.
54. Copeland L., Blazek J., Salman H., Chiming Tang M. 2009. Form and functionality of starch. Food Hydrocolloids 23:1527-1534.
55. Corn Refiners Association, World corn production, consumption and stocks, 2012. [Online]: <http://www.corn.org/publications/statistics/world-corn-production/> (05.07.2012)
56. Cotrill B.R., Smith T.C., Berry P., Weightman R.M., Weiseman J., White G., Temple M. 2007. Opportunities and implications of using the co-products from biofuel production as feeds for livestock, HGCA Review 66. HGCA, Agriculture and Horticulture Development Board, Stoneleigh Park, Warwickshire, UK.
57. Croezen H., Brouwer F. 2008. Estimating indirect land use impacts from by-products utilization, Report by Delft, CE, commissioned by AEA Technology as part of the UK Gallagher Review.
58. Cromwell G.L. 1979. Availability of phosphorus in feedstuffs for swine. In: Proceedings of the Distillers Feeds Research Council. March 29. 1979. Louisville. KY. Distillers Feed Research Council. Cincinnati. OH. 34: 40-52.
59. Cronje D.A., Bason A.J., Theron S.J., Viljoen J.H. 1991. Quality changes in maize during export. In: Hill (Ed), Uniformity by 2000, pp. 323-346. International workshop on maize and soybean quality, Scherer Communications, Urbana, Illinois, USA.

60. Ćurić D., Karlović D., Tripalo B., Ježek D. 1998. Enzymatic conversion of corn starch in twin-screw extruder. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 12:63-71.
61. Dado R.G., Beek S.D. 1998. In vitro ruminal starch digestibility in opaque-2 and regular corn hybrids. *Animal Feed Science and Technology* 73:151-160.
62. Daugulis A.J., McLellan P.J., Li J. 1997. Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 56:99-105.
63. De Cordt S., Hendrickx M., Maesmans G., Tobback P. 1994. The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of α -amylase. *Biotechnology and Bioengineering* 43:107-114.
64. DeFraiture C., Giordano M., Liao Y. 2008. Biofuels and implications for agricultural water use: blue impacts of green energy. *Water Policy* 1(10):67-80.
65. Demirbas A. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy* 86:5108-5117.
66. Demirbas A. 2008. Biohydrogen generation from organic wastes. *Energy Sources Part A* 30:475-82
67. Demirbas A. 2007. Producing and using bioethanol as an automotive fuel. *Energy sources Part B* 2:391-401.
68. Demirbas A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass, *Energy Sources A* 27:327-337.
69. Determination of starch content – Ewers polarimetric method. *International Standard: ISO 10520 1997*.
70. Dien B.S., Bothast R.J., Iten L.B., Barrios L., Eckhoff S.R. 2002. Fate of Bt protein and influence of corn hybrid on ethanol production. *Cereal Chemistry* 79:582-585.
71. Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council, 23 April 2009, On the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC [Online]: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:140:0016:0062:en:PDF> (21.09.2012)
72. Domalski E.S., Jobe Jr. T.L., Milne T.A. 1986. Thermodynamic data for biomass conversion and waste incineration. *National Bureau of Standards and Solar Energy Institute*. p. 324.

73. Donald A.M., Waigh T.A., Jenkins P.J., Gidley M.J., Debet M., Smith A. 1997. Internal structure of starch granules revealed by scattering studies. In: Frazier P. J., Donald A. M., Richmond P. (Eds), Starch: Structure and Functionality. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 172–179.
74. Drapcho C.M., Nhuan N.P., Walker T.H. 2008. Biofuels Engineering Technology, Malestrom.
75. Đorđević N., Dinić B. 2006. Koncentrati za domaće životinje, divljač i ribe. Nolit, Beograd.
76. Đukić-Vuković A.J., Mojović Lj.V., Pejin D., Vukašinović-Sekulić M., Rakin M., Nikolić S., Pejin J. 2011. Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama. Hemijska industrija 65:411-422.
77. Eckoff S. R., Tso C. C. 1991. Starch recovery from steeped corn grits as affected by drying temperature and added commercial protease. Cereal Chemistry 68(3):319-320.
78. Eckoff S.R. 1999. High extractable corn starch: What is it? Wet milling notes, Note No. 17, February. Department of Agricultural Engineering, University of Illinois, USA.
79. Eckoff S.R., Rausch K.D., Fox E.J., Tso C.C., Wu X., Pan Z., Buriak P. 1993. A laboratory wet milling procedure to increase reproducibility and accuracy of product yields. Cereal Chemistry 70(6):723-727.
80. Eckoff S.R., Singh S.K., Zehr B.E., Rausch K.D., Fox E.J., Mistry A.K., Haken A.E., Niu Y.X., Zou S.H., Buriak P., Tumbleson M.E., Keeling P.L. 1996. A 100-g Laboratory Corn Wet-Milling Procedure. Cereal Chemistry 73:54-57.
81. Erickson G.E., Klopfenstein T.J., Adams D.C., Rasby R.J. 2005. General overview of feeding corn milling coproducts to beef cattle. In: Corn Processing Co-Products Manual, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA.
82. Ewers E. 1908. Die polarimetrisch Analyse des Stärkegehaltes. Zeitschrift für öffentliche Chemie 14:150-157.
83. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. Appx. xvi Methods of Feed Analysis. [Online]: <http://www.fao.org/docrep/S4314E/s4314e0v.htm> (16.05.2012)
84. Fiene S.P., York T.W., Shasteen C. 2006. Correlation of DDGS IDEA™ digestibility assay for poultry with cockerel true amino acid digestibility. Pp. 82-89 In:

Proc. 4th Mid-Atlantic Nutrition Conference. University of Maryland. College Park. MD.

85. Freudenberger R. 2009.a Chapter 1: About alcohol fuel, pp. 3-21. In: Alcohol fuel. New society publishers. Gabriola Islands, Canada.

86. Freudenberger R. 2009.b Chapter 9: Alcohol as an engine fuel, pp. 155-205. In: Alcohol fuel. New society publishers. Gabriola Islands, Canada.

87. Galliard T. 1987. In starch: properties and potential. Chichester, U.K.: John Wiley and Sons.

88. GBC, Global BiofuelsCenter. 2012. TOP 25 – Global ethanol and biodiesel capacity. [Online]: www.globalbiofuelscenter.com/NM_Top5.aspx (22.01.2013)

89. Gestencorn P. 1991. Measurement technology for determining hardness of corn, "Uniformity by 2000" An workshop on maize and soybean quality, UrbanaIllinois, USA.

90. Ghosh P., Ghose T.K. 2003. Bioethanol in India: recent past and emerging future, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology85:1–27.

91. Global Carbon Project, [Online]: <http://www.globalcarbonproject.org/> (22.01.2013)

92. Gnansounou E. 2009. Fuel ethanol Current Status and Outlook. pp 57-70. In: Handbook of plant-based biofuels. A. Pandey, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.

93. Goering, H.K. and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). USDA Agricultural Research Service. Handbook number 379 as modified by D.R. Mertens 1992.

94. Graboski M.S. 2002. Fossil energy use in the manufacture of corn ethanol, Prepared for the National Corn Growers Association.

95. Grafelman D.D., Meagher M.M., 1995. Liquefaction of starch by a single-screw extruder and post-extrusion static-mixer reactor. Journal of Food Engineering 24:529-542.

96. Graves T., Narendranath N.W., Dawson K., Power R. 2007. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. Applied Microbiology and Biotechnology 73:1190-1196.

97. Graves T., Narendranath N.W., Dawson K., Power R. 2006. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 33:469-474.

98. Global Renewable Fuels Alliance - GRFA. 2012. Global ethanol production to reach 85.2 billion liters in 2012, [Online]:www.globalrfa.com/pr_062612.php (22.01.2013)
99. GRID-Arendal, 2012. Global ethanol production.[Online]:<http://www.grida.no> (07.03.2103)
100. Gulati M., Kohlman K., Ladisch M.R., Hespell R., Bothast R.J. 1996. Assesment of ethanol production options for corn products. *Bioresource Technology* 58:253-264.
101. Gulati M., Westgate P.J., Brewer M., Hendrickson R., Ladisch M.R. 1996.a Sorptive recovery of dillute ethanol from distillation column bottoms stream. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57(8):103-119.
102. Haefele D., Owens F., O'Bryan K., Sevenich D. 2004. Selection and optimization of corn hybrids for fuel ethanol production. In: *Proceedings of the American Seed Trade Association 59th Annual Cornand Sorghum Research Conference*. December 2004. Alexandria. VA (CD-ROM). American Seed Trade Association. Alexandria. VA.
103. Ham G.A., Stock R.A., Klopfenstein T.J., Larson E.M., Shain D.H., Huffman R.P. 1994. Wet corn distillers byproducts compared with dried corn distillers grains with solubles as a source of protein and energy for ruminants. *Journal of Animal Science* 72:3246-3257.
104. Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-, and long-term. *Biomass and Bioenergy* 28:384-410.
105. Haros M., Tolaba M-P., Suarez C. 2003. Influence of corn drying on its quality for the wet-milling process. *Journal of Food Engineering* 60:177–184.
106. Helm J.L., Fergesan V.L., Zuber M.S. 1968. Effect of planting date on high amylose corn (*Zea Mays* L). *Agronomy Journal* 60:530–531.
107. Hertel T.H., Tyner W.E., Birur D.K. 2008. Biofuels for all? Understanding the global impacts of multinational mandates, West LaFayetteIN: PurdueUniversity, Department of Agricultural Economics, Center for Global Trade Analysis.
108. Hizukuri S. 1986. Polymodal distribution of chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrates Research* 147: 342–347.
109. Hofstand D. 2008. International perspectives on food and fuel. *AgMRC Renewable Energy Newsletter*.

110. Hooseney R.C., 1986. Principles of Cereal Science and Technology, first ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
111. Hsu K.H., Kim C.J., Wilson L.A. 1983. Factors affecting water uptake of soybeans during soaking. *Cereal Chemistry* 60:208-211.
112. Huang J.F., Chen M.Y., Lee H.F., Wang S.H., Hu Y.H., Chen Y.K. 2006. Effects of corn distillers dried grains with soluble on the productive performance and egg quality of brown tsaiya duck layers. Personal communication with Y.K. Chen agape118@sonet.net.tw.
113. Huang W-D., Zhang Y-H.P. 2011. Analysis of biofuels production from sugar based on three criteria: Thermodynamics, bioenergetics, and product separation. *Energy & Environmental Science* 4:784-792.
114. ICIS pricing. 2012. Sample report: 8th august 2012. ethanol (USA) [Online]:http://www.icispricing.com/il_shared/Samples/SubPage173.asp (13.02.2013)
115. Ingledew W.M. 1999. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3rd ed. UK: NottinghamUniversity Press.
116. Ingram L.O. 1984. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnology* 4:40-44.
117. Jackson D.S., Gomez M.H., Waniska R.D., Rooney L.W., 1990. Effects of single-screw extrusion cooking on starch as measured by aqueous high-performance size-exclusion chromatography. *Cereal Chemistry* 67:529-532.
118. Jane J. 2004. Starch structure and properties. Pages 81-103 in: Chemical and functional properties of food saccharides, Piotr Tomasik, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
119. Jane J. 2006. Current understanding on starch granule structures. *Journal of Applied Glycoscience* 53:205-213.
120. Jane J., Chen Y.Y., Lee L.F., McPherson A.E., Wong K.S., Radosavljević M., Kasemsuwan T. 1999. Effect of amylopectin branch chain-length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry* 76(5):629-637.
121. Jeremić K., Stojanović Ž., Jovanović S. 2000. Modification of starch properties. *Hemijska industrija* 54:434-446.
122. Johnson L.A. 1994. Corn processing and utilization, *Encyclopedia of Agricultural Science*, Volume 1, Academic Press, Inc.
123. Juliano B. O. 1993. Rice in human nutrition. United Nations Food and Agriculture Organization (FAO).

124. Karakatsanis A., Liakopoulou–Kyriakides M. 1998. Comparative study of hydrolysis of various starches by alpha amylase and glucoamylase in PEG-dextran and PEG-substrate aqueous two phase systems. *Starch-Stärke* 50:194-199.
125. Katahira S., Mizuike A., Fukuda H., Kondo A. 2006. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:1136–1143.
126. Kelsall D.R., Lyons T.P. 2003. Grain dry milling and cooking procedures. In: *The alcohol textbook*. 4th ed. K.A. Jaques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall eds. Nottingham University Press: England.
127. Kendereški S. 1986. *Osnovi enzimologije*, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
128. Kim J.S., Kim B.G., Lee C.H., Kim S.W., Jee Koh J.H., Fan A.G. 1997. Development of clean technology in alcohol fermentation industry. *Journal of Cleaner Production* 5(4):263-267.
129. Kim S., Dale B.E. 2005. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass and Bioenergy* 28:475-489.
130. Kim Y., Mosier N.S., Hendrickson R., Ezeji T., Blaschek, Dien B., Cotta M., Dale B., Ladisch M.R. 2008. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. *Bioresource Technology* 99:5165-5176.
131. Klopfenstein T.J. 1997. Distillers grains as an energy source and effect of drying on protein availability. *Animal Feed Science and Technology* 60:201-207.
132. Klopfenstein T.J., Erickson G.E., Bremer V.R. 2008. Board-invited review: Use of distillers byproducts in the beef cattle feeding industry. *Journal of Animal Science* 86:1223-1231.
133. Klopfenstein T. 1996. Need for escape protein by grazing cattle. *Animal Feed Science and Technology* 60:191-199.
134. Knežević-Jugović Z. 2008. *Enzimsko inženjerstvo*, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
135. Kojima M., Johnson T. 2005. Potential for biofuels for transport in developing countries, Energy sector management assistance programme, joint UNDP/World Bank, Washington DC.

136. Kolusheva T., Marinova A. 2007. A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α -amylase. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 42:93-96.
137. Kong L., Li G., Zhang B., He W., Wang H. 2008. Hydrogen production from biomass wastes by hydrothermal gasification. *Energy Sources Part A* 30:1166-1178.
138. Kwiatkowski J.R., McAloon A.J., Taylor F., Johnston D.B., 2006. Modelling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry grind process. *Industrial Crops and Products* 23:288-296.
139. Ladely S.R., Stock R.A., Goedecken F.K., Huffman R.P. 1995. Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. *Journal of Animal Science* 73:360-364.
140. Ladisch M.R., Dyck K. 2005. Dehydration of ethanol - new approach gives positive energy-balance. *Science* 205(4409):898-900.
141. Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J. Jr., Antal M.J., Lynd L.R. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion. *Bioresource Technology* 81(1):33-44.
142. Lazić M.L., Rašković S., Stanković M.Z., Veljković V.B. 2004. Enzimska hidroliza krompira i dobijanje etanola. *Hemijska industrija* 58:322-326.
143. Lee, S. 2007. Ethanol from corn. pp: 323-341. In: *Handbook of alternative fuel technologies*. Sunggyu Lee, James G. Speight, and Sudarshan K. Loyalka, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
144. Lee Y.C., Kim K.T., 1990. Gelatinization and liquefaction of starch with a heat stable α -amylase. *Journal of Food Science* 55:1365-1372.
145. Lemuz C.R., Dien B.S., Singh V., McKinney J., Tumbelson M.E., Rausch K.D. 2009. Development of an ethanol yield procedure for dry-grind corn processing. *Cereal Chemistry* 86:355-360.
146. Lewis S. M., Van Hulzen S.E., Roth D. L. 2005. Continuous process for producing ethanol using raw starch. U.S. Patent number 20050239181.
147. Lewis S. M., Van Hulzen S.E., Roth D. L. 2010. Continuous process for producing ethanol using raw starch. U.S. Patent number 20100041116, 2010.
148. Licht F.O. 1999. World ethanol production. *Alcohol Journal*, Altech 1:6.
149. Licht F.O. 2008. World Ethanol 2008: Ethanol in 2008/09 - Light at the end of the tunnel? , [Online]: <http://google.brand.edgar->

online.com/EFX_dll/EDGARpro.dll?FetchFilingHTML1?ID=5866612&SessionID=rLkIHFq_OCp6n47 (25.06.2012)

150. Lin T., Rodriguez L.F., Li C., Eckoff S.R. 2011. An engineering and economic evaluation of wet and dry pre-fractionation processes for dry-grind ethanol facilities. *Bioresource Technology* 102:9013-9019.
151. Lin Y. Tanaka S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:627-642.
152. Liu S.X., Singh M., Inglett G. 2011. Effect of incorporation of distillers' dried grain with solubles (DDGS) on quality of cornbread, *Food Science and Technology* 44:713-718.
153. Liska A.J., Yang H.S., Bremer V.R., Klopfenstein T.J., Walters D.T., Erickson G.E., Cassman K.G. 2009. Improvements in life cycle energy efficiency and greenhouse gas emissions of corn ethanol. *Journal of Industrial Ecology* 13:58-74.
154. Lohrmann T., Paustin D., Hammes D., Nikolov Z. 2008. Process for improving products of dry milling, US Patent 2008/0279983 A1, Nov. 13, 2008.
155. Loar R.E., Moritz J.S., Donaldson J.R., Corzo A. 2010. Effects of feeding distillers dried grains with solubles to broilers from 0 to 28 days posthatch on broiler performance, feed manufacturing efficiency, and selected intestinal characteristics. *Poultry Science* 89:2242-2250.
156. Lumpkins B., Batal A., Dale N. 2004. Evaluation of distillers dried grains with solubles as a feed ingredient for broilers. *Poultry Science* 83:1891-1896
157. Lynd L.R. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, Economics, the Environment, and Policy. *Annual Review of Energy and Environment* 21:403-465.
158. Lynd L.R., Weimar P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):506-577.
159. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Nutrition and metabolism. *Brock biology of microbiology*. 7th ed. NJ: Prentice-Hall.
160. Malumba P., Massaux C., Deroanne C., Masimango T., Bera F., 2009. Influence of drying temperature on functional properties of wet-milled starch granules. *Carbohydrate Polymers* 75:299-306.

161. Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology* 20:372-380.
162. Market Research Media. 2011. Global Biofuel Production Forecast 2015-2020, <http://www.marketresearchmedia.com/2011/05/12/biofuel-market/>
163. Mayalagu S., Patturajan M., Chatterji D. 1997. The presence of two tightly bound Zn²⁺ ions is essential for the structural and functional integrity of yeast RNA polymerase II. *Gene* 190:77-85.
164. McAllon A., Taylor F., Yee W., Ibsen K., Wooley R. 2000. Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks, NREL/TP-580-28893, Colorado, USA: National Renewable Energy Laboratory.
165. McGrance S.J., Cornell H.J., Rix C.J. 1998. A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. *Starch* 50:158-163.
166. McLellan P.J., Daugulis A.J., Li J. 1999. The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Progress* 15:667-680.
167. Meagher M.M., Grafelman D.D. 1999. Method for liquefaction of cereal grain starch substrate and apparatus therefore. U.S. patent 5.981.237.
168. Medić J. 2011. Starch properties, endogenous amylases activity, and ethanol production of corn kernels with different planting dates and drying conditions, doktorska disertacija. IowaStateUniversity, Ames, Iowa.
169. Mertens D.R. 1992. Critical Conditions in determining detergent fiber, in Proceedings of the Forage Analysis Workshop, Sept. 16-17, 1992, Denver, Colorado, National Forage Testing Association, Omaha, NE, pp. C1-C8.
170. Milašinović M. 2005. Fizičke, hemijske i tehnološke karakteristike novih ZP hibrida kukuruza. Magistarski rad. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
171. Milašinović M., Radosavljević M., Dokić Lj., Jakovljević J., Kapusniak J., Jane J. 2007. Tehnološka vrednost u skrobarskoj preradi i karakterizacija skroba različitih genotipova kukuruza, XVI simpozijum Žito-hleb: „Tehnologija, kvalitet i bezbednost hrane“, Novi Sad 13-15- novembar 2007., Zbornik radova, 105-112 str.
172. Milijanović M. 2005. Optimizacija procesa hidrolize kukuruznog brašna u cilju dobijanja bioetanola, Diplomski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

173. Mishra S., Rai T., 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids* 20(5):557-566.
174. Mitchell D. 2008. A note on rising food prices, World Bank Development Prospects Group, World Bank Washington DC.
175. Mohd B.M.N., Wootton M. 1984. In vitro digestibility of hydroxypropyl maize waxy maize and high amylose maize starches. *Starch-Stärke* 36:273-275.
176. Mojović L., Nikolić S., Rakin M., Vukašinić M. 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel* 85:1750-1755.
177. Mojović L., Pejin D., Grujić O., Markov S., Pejin J., Rakin M., Vukašinić M., Nikolić S., Savić D. 2009. Progress in the production of bioethanol on starch-based feedstocks. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 15(4):221-226.
178. Mojović L., Pejin D., Rakin M., Pejin J., Nikolić S., Djukić-Vuković A. 2012. How to improve the economy of bioethanol production in Serbia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:6040-6047.
179. Mojović L., Pejin D., Rakin M., Vukašinić M., Pejin J., Grujić O., Nikolić S., Radosavljević M. 2010. Ispitivanje mogućnosti korišćenja džibre iz proizvodnje bioetanola iz kukuruza, *PTEP* 14:54-57.
180. Mojović Lj., Pejin D., Lazić M. 2007. Bioetanol kao gorivo-stanje i perspektive, monografija, Tehnološki fakultet, Leskovac.
181. Montesinos T., Navarro J-M. 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 37:362-370.
182. Morison J.I.L., Hadley P., Ledward, D.A. 1995. Effects of elevated growth temperature and carbon dioxide levels on some physicochemical properties of wheat starch. *Journal of Cereal Science* 22:65-71.
183. Mousdale D.M. 2008. *Biofuels: Biotechnology, chemistry, and sustainable development*. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, USA. p. 250.
184. Murthy G.S., Sall E.D., Metz S.F., Foster G., Singh V. 2009. Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. *Industrial Crops and Products* 29(1):67-72.
185. Murthy G.S., Singh V., Johnston D.B. Rausch K.D., Tumbelson M.E., 2006. Evaluation and strategies to improve fermentation characteristics of modified dry-grind corn processes. *Cereal Chemistry* 83(5):455-459.

186. Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C. 2006. Brewers' spent grain: generation characteristics, and potential applications, *Journal of Cereal Science* 43:1-14.
187. Naidu K., Singh V., Johnston D.B., Rausch K.D., Tumbleson M.E. 2007. Effects of ground corn particle size on ethanol yield and thin stillage soluble solids. *Cereal Chemistry* 84:6-9.
188. National Research Council - NRC 1998. Nutrient Requirements of Swine, 10th ed. National Academy Press, Washington, DC. [Online]: <http://www.nap.edu/openbook.php?recordid=6016&page=3> (18.05.2012)
189. Negro M.J., Manzanares P., Ballestros I., Oliva J.M., Cabanas A., Bellestros M. 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105:87–100.
190. Niemiec J., Riedel J., Szulc T., Stepinska M. 2013. Feeding corn distillers grains with solubles (DDGS) and its effect on egg quality and performance of laying hens. *Annals of Animal Science* 13(1):97-107
191. Nikolić S. 2009. Proizvodnja bioetanola kao alternativnog goriva iz kukuruza pomoću slobodnog i imobilisanog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko- metalurški fakultet, Beograd.
192. Nikolić S., Mojović L., Pejin D., Rakin M., Vučurović V. 2009a. Improvement of ethanol fermentation of hydrolyzates of corn semolina by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoideus* by media supplementation, *Food Technology and Biotechnology* 47:83-89.
193. Nikolić S., Mojović L., Rakin M., Pejin D. 2009. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel* 88:1602-1607.
194. Nikolić S., Mojović L., Rakin M., Pejin D., Nedović V. 2009. Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:497–503.
195. Nikolić S., Mojović L., Rakin M., Pejin D., Pejin J. 2010. Ultrasound- assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chemistry* 122: 216-222.
196. Nikolić S., Mojović L., Rakin M., Pejin D., Savić D. 2008. A microwave assisted liquefaction as a pretreatment for bioethanol production by the simultaneous

saccharification and fermentation of corn meal. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 14:231-234.

197. Nikolić S., Rakin M., Vukašinović M., Šiler-Marinković S., Mojović L. 2005. Bioethanol from corn meal hydrolyzates. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 11:189-194

198. Nikolov Z.L., Wilken L.R., Lohrmann T., Hammes D. 2012. Processes, opportunities and challenges for improving corn (maize) – to – ethanol, CEFood 2012, 6th Central European Congress on Food, May 23-26, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 25.

199. Nocek J.E., Tamminga S. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. Journal of Dairy Science 74:3598-3629.

200. Noda T., Tohnooka T., Taya S., Suda I. 2001. Relationship between physicochemical properties of starches and white salted noodle quality in Japanese wheat flours. Cereal Chemistry 78:395-399.

201. Noll S.L., Brannon J. 2005. Influence of dietary protein level and inclusion level of DDGS on performance of market tom turkeys. Minnesota Turkey Growers Association, Gobblers 62:6-8.

202. Nuez Ortin W.G., Yu P. 2009. Nutrient variation and availability of what DDGS, corn DDGS and blend DDGS from bioethanol plants. Journal of Science of Food and Agriculture 89:1754-1761.

203. Ogier J.C., Ballerini D., Leygue J.-P., Rigal L., Pourquie J. 1999. Production d'ethanol a partir de biomasse lignocellulosique, Oil Gas Sci. Technol. - Revue de l'IFP 54(1):67–94.

204. Ojumu T.V., Ogunkunle O.A. 2005. Production of glucose from lignocellulosic under extremely low acid and high temperature in batch process, auto-hydrolysis approach. Journal of Applied Science 5(1):15–17.

205. Owens F. 2005. Corn genetics and animal feeding value. Pioneer Hi-Bred International, Inc. Johnston, IA. [Online]: [www.ddgs.umn.edu/articles-proc-storage-quality/2005-Owens\(MNC\)Corngenetics.pdf](http://www.ddgs.umn.edu/articles-proc-storage-quality/2005-Owens(MNC)Corngenetics.pdf) (18.05.2012)

206. Palonen H., Viikari L., 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. Biotechnology and Bioengineering 86:550–557.

207. Patzek T.W. 2005. Thermodynamics of the corn-ethanol biofuel cycle. Critical Reviews in Plant Sciences 23(6):519-567.

208. Patzek T.W. 2007. A first-law thermodynamic analysis of the corn ethanol cycle. *Natural Resources Research* 15(4):255-270.
209. Paul J.K. 1980. Large and small scale ethyl alcohol manufacturing processes from agricultural raw materials, New Jersey: Noyes Data Corp.
210. Pejić Đ. Silažni kukuruz – Tehnologija proizvodnje i siliranje. 1994. Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd-Zemun.
211. Pejin D., Razmovski R. 1992. Investigation of the influence of copper and calcium ions on fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized cells in the ethanol manufacturing process. *Chemical Industry* 46:133-137.
212. Pejin D., Glavardanov R., Gaćeša S., Popov S. 2000. Alkohol kao gorivo – Pogled u budućnost, Peto savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, Vrnjačka Banja, 2000., str. 29-38.
213. Pejin D., Mojović L., Grujić O., Pejin J., Rakin M. 2009. The bioethanol production with the thin stillage recirculation, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 15:49–52.
214. Pejin D., Mojović L., Pejin J., Grujić O., Markov S., Nikolić S. et al. 2012. Increase in bioethanol production yield from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with application of ultrasound. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87:170-176.
215. Pejin D., Mojović L., Vučurović V., Pejin J., Denčić S., Rakin M. 2009. Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: a comparative study. *Fuel* 88:1625-1628.
216. Peplinski A. J., Paulis J. W., Bietz J. A., Pratt, 1994. Drying of high-moisture corn: changes in properties and physical quality. *Cereal Chemistry* 71(2):129-133.
217. Pieper H.J., Pönitz H., 1973. Zur Gewinnung von Gärungsalkohol aus siliertem Körnermais. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2. 174-179.
218. Piletić M.V., Milić B.Lj., Đilas S.M. 1993. *Organska hemija, II deo, Prometej*, Novi Sad, str. 287.
219. Pimentel D. 2003. Ethanol fuels, Energy balance, economics and environmental impacts are negative. *Natural Resources Research* 12(2):127-134.
220. Pimentel D. 2001. Ethanol fuel from corn faulted as unsustainable unsubsidized food burning in analysis of Cornell scientist. [Online]: <http://www.news.cornell.edu/releases/Aug01/corn-basedethanol.hrs.html>. (05.01.2013)

221. Pomerantz Y., Czuchajowska Z., Martin C.R., Lai F.S. 1985. Determination of Corn Hardness by the Stenvert Hardness Tester. *Journal of Cereal Chemistry* 62:108-112.
222. Potters G., Goethem D., Schutte F. 2010. Promising biofuel resources: lignocellulose and algae. *Nature Education* 3(9):14.
223. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje. 2010. Službeni glasnik RS 41/09. 2010. [Online]: <http://www.mpt.gov.rs/postavljen/125/4827010.0062.4-1.pdf> (17.05. 2012)
224. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane.1987. (objavljen u "Sl. listu SFRJ", br. 15/87), [Online]:<http://www.podaci.net/z1/9128867/P-muumfh02v8715.html> (28.02.2013)
225. Pravilniku o kvalitetu skroba i proizvoda od skroba za prehrambene svrhe. 1996. Na osnovu člana 81. Zakona o standardizaciji ("Službeni list SFRJ". br. 37/88 i 23/91). objavljen u "Službenom listu SRJ". br. 33/95 i stupio na snagu 15. januara 1996. godine.
226. Privredna komora Srbije. 2012. [Online]: <http://pks.rs/PrivredaSrbije.aspx?id=13&p=2&> (19.01.2013)
227. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2002. *Microbiology, Fifth Edition*, The McGraw-Hill Companies.
228. Radosavljević M. 2001. Unapređenje tehnološkog postupka za dobijanje skroba, Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi /PTEP, vol. 5, str. 70-74.
229. Radosavljević M. 2005. Visokovredna hrana na bazi kukuruza – Ekstrudovane i mikronizovane pahuljice. Elaborat projekata Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije ev. Br. BTN.2.1.2.0708.B. Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd-Zemun.
230. Radosavljević M., Božović I., Jovanović R., Bekrić V., Žilić S., Terzić D. 2002. Visokovredna hrana i novi tehnički proizvodi na bazi kukuruza i soje, Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi / PTEP, vol. 6, br. 1-2, str. 54-60.
231. Radosavljević M., Jovanović R., Pajić Z., Milašinović-Šeremešić M., Terzić D. 2010. The development of a new assortment of food and feed by the application of micronisation and extrusion. *Extrusion technology in food and feed processing. Thematic Proceedings*. Novi Sad, 19-21. october 2010. pp. 168-174.
232. Radosavljević M., Milašinović M. 2008. ZP hibridi kukuruza kao sirovina za proizvodnju skroba. *PTEP - Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi* 12(4):191-195.

233. Radosavljević M., Milašinović M., Pajić Z., Filipović M. 2009.a. Skrob u hrani za životinje. XIII simpozijum: Tehnologija hrane za životinje, Novi Sad, 29.09-01.10. 2009., Zbornik radova, str. 20-28.
234. Radosavljević M., Mojović Lj., Rakin M., Milašinović M. 2009. ZP hibridi kukuruza kao sirovina za proizvodnju bioetanola. PTEP 13(1):45-49
235. Radosavljević M., Mojović Lj., Semenčenko V., Milašinović M. 2009. Upotrebna vrednost zrna hibrida kukuruza različite genetičke osnove. Zbornik abstrakata IV kongresa genetičara Srbije, Tara, jun 2009., str.217.
236. Radosavljević M., Milašinović-Šeremešić M., Terzić D., Todorović G., Pajić Z., Filipović M., Kaitović Ž., Mladenović Drinić S. 2012. Effects of hybrid on maize grain and plant carbohydrates. Genetika 44(3):649-659.
237. Rajković J., Mirić M., Baras J. 1983. Analiza životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
238. Rakin M., Mojović L., Nikolić S., Vukašinović-Sekulić M., Pejin D. 2009.a Poboljšanje kvaliteta džibre kao stočne hrane nakon proizvodnje bioetanola. Ecologica 16:151-154.
239. Rakin M., Mojović Lj., Vukašinović Sekulić M., Saičić S., Milićević D., Pejin D. 2009. Mogućnosti poboljšanja kvaliteta džibre kao stočne hrane nakon proizvodnje bioetanola iz skrobnih sirovina, XIII međunarodni simpozijum Tehnologija hrane za životinje, Zbornik radova, Novi Sad, 29.09 - 01.10.2009., str. 300-306.
240. Rakin M., Nikolić S., Mojović Lj., Vukašinović M., Marinković-Šiler S., Nedović V., 2006. Dobijanje bioetanola iz kukuruza primenom različitih kultura kvasca, Racionalno korišćenje energije u metalurgiji i procesnoj industriji. Monografija, Jugoslovenska inženjerska akademija, 139-146.
241. Ramirez E.C., Johnston D.B., McAloon A.J., Singh V. 2009. Enzymatic corn wet milling: engineering process and cost model. Biotechnology for Biofuels Vol 2, Article 2 [Online]: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/2>. (08.03.2013)
242. Rasmussen M. 2009. Enhancing dry-grind corn ethanol production with fungal cultivation and ozonation. Thesis (Ph.D)-IowaStateUniversity.
243. Rausch K.D., Belyea R.K., Eilersieck M.R., Singh W., Johnston D.B., Tumbelson M.E. 2005. Particle size distributions of ground corn and DDGS from dry grind processing, Trans. ASAE 48:273-277.

244. Renewable Fuels Association - RFA. 2011. [Online]: <http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-85.9-billion-litres-22.7-billion-ga/> (07.07.2012)
245. Renewable Fuels Association - RFA. 2012. [Online]: [Acelerating Industry Innovation - 2012 Ethanol Industry Outlook](http://www.ethanolrfa.org/news/entry/accelerating-industry-innovation-2012-ethanol-industry-outlook), http://ethanolrfa.3cdn.net/d4ad995ffb7ae8fbfe_1vm62ypzd.pdf (07.07.2012)
246. Renewable Fuels Association - RFA. 2012.a Pocket Guide to Ethanol [Online]: www.EthanolRFA.org (07.03.2013)
247. Renewable Fuels Association - RFA. 2012.b[Online]: <http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-85.2-billion-litres-in-2012/> (07.03.2013)
248. Rodriguez L.F, Li C, Khanna M., Spaulding A., Lin T., Eckoff S.R. 2010. An engineering and economic evaluation of quick germ quick fiber process for dry-grind ethanol facilities: Analysis. *Bioresource Technology* 101:5282-5289.
249. Roher M. 2001. *The biotechnology of ethanol*, Wiley-VCH Verlag.
250. Sanchez O.J., Cardona C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology* 99:5270-5295.
251. Searchinger T., Heimlich R., Houghton R.A. et al. 2008. Use of U.S. croplands for biofuels increases green house gases through emissions from land use change. *Scienceexpress* 319:1238-1240.
252. Seetharaman K., Bertoft E. 2012. Perspectives on the history of starch, Part I, II. *Starch/Stärke* 64:677-682, 765-769.
253. Semenčenko V., Mojović L., Đukić-Vuković A., Radosavljević M., Terzić D., Milašinović Šeremešić M. 2013. Suitability of some selected maize hybrids from Serbia for the production of bioethanol and dried distillers' grains with solubles. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 811–818.
254. Semenčenko V., Mojović Lj., Radosavljević M., Terzić D., Milašinović-Šeremešić M., Janković M. 2013.a Mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda prerade kukuruznog zrna iz proizvodnje etanola i skroba. *Hemijska industrija*, Online first (00):90-90, doi:10.2298/HEMIND120405090S.
255. Semenčenko V., Mojović Lj., Petrović S., Očić O. 2011. Novi trendovi u proizvodnji bioetanola. *Hemijska industrija* 65(2):103–114.
256. Semenčenko D., Radosavljević M., Semenčenko V. 2009. Uloga i mesto istraživanja i primene biogoriva u strategijama razvoja obnovljivih izvora energije,

Sym-op-is, XXXVI Simpozijum o operacionim istraživanjima, Ivanjica, septembar 2009.

257. Shahbazi A., Li Y., Mims M.R. 2005. Application of sequential aqueous steam treatments to the fractionation of softwood, *Appl. Biochem. Biotech.* 26:973-968.

258. Shapouri, H., Gallagher, P. W., Nefstead, W., Schwartz, R., Noe, S., and Conway, R. 2010. 2008 energy balance for the corn-ethanol industry. United States Department of Agriculture. Agricultural Economic Report Number 846. [Online]: http://www.usda.gov/oce/reports/energy/2008Ethanol_June_final.pdf. (14.04.2010)

259. Shapouri H., Duffield J.A., Graboski M.S. 1995. Estimating the net energy balance of corn ethanol, Agricultural Economic report 721, US Department of Agriculture, WashingtonDC, USA.

260. Shapouri H., Duffield J.A., Wang M. 2002. The energy balance of corn ethanol: an update, Agricultural Economic report 813, US Department of Agriculture, WashingtonDC, USA.

261. Shi Y.-C., Seib P.A., Bernardin J.E. 1994. Effects of temperature during grain filling on starches from six wheat cultivars. *Cereal Chemistry* 71:369–383.

262. Shukla R., Cheryan M. 2001. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* 13:171-192.

263. Singh S., Gupta A. K., Gupta S. K., Kaur N. 2010. Effect of sowing time on protein quality and starch pasting characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L) genotypes grown under irrigated and rain-fed conditions. *Food Chemistry* 122:559-565.

264. Singh H., Graeber J.V. 2005. Effect of corn hybrid variability and planting location on dry grind ethanol production. *Trans Transactions of the American Society of Agricultural Engineers (ASAE)* 48:709–714.

265. Singh V. Moreau R.A., Doner L.W., Eckoff S.R., Hicks K.B. 1999. Recovery of fiber in the corn dry-grind ethanol process: a feedstock for valuable coproducts. *Cereal Chemistry* 76(6):868-872.

266. Singh V., Eckoff S.R. 1997. Economics of germ pre-separation for dry-grind ethanol facilities, *Cereal Chemistry* 74(4): 462-466.

267. Singh V., Moreau R.A., Hicks K.B., Beleya R.L., Staff C.H. 2002. Removal of fiber from distillers dried grains with solubles (DDGS) to increase value, *Trans. ASAE* 45:389-392.

268. Singh V., Moreau R.A., Srinivasan R., Tumbleson M.E., Belyea R.L., Rausch K.D. 2005.a. Separation of fiber from distiller dried grains with solubles (DDGS) using sieving and elutriation. *Cereal Chemistry* 82(5):528-533.
269. Singh V., Tumbleson M.E., Belyea R.L., Rausch K.D., Johnston D.B., Naidu K. 2005.b. Comparison of modified dry-grind corn process for fermentation characteristics and DDGS composition. *Cereal Chemistry* 82(2):187-190.
270. Smith A.M. 2008. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *Plant Journal* 54:546-558.
271. Smith T.C., Kindred D.R., Brosnan J.M., Weightman R.M., Shepherd M., Sylvester-Bradley R. 2006. Wheat as a feedstock for alcohol production, HGCA Research Review No. 61. HGCA, Agriculture and Horticulture Development Board, Stoneleigh Park, Warwickshire, UK.
272. Soderstrom J., Pilcher L., Galbe M., Zacchi G. 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production, *Biomass and Bioenergy* 24:475-486.
273. Sodhi K.H., Sharma K., Gupta J.K., Sony S.K. 2005. Production of a thermostable amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry* 40:525-534.
274. Spiehs M.J., Whitney M.H., Shurson G.C. 2002. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota. *Journal of Animal Science* 80:2639-2645.
275. Sprenger G.A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*. 145:301-307.
276. Srichuwong S., Gutesa J., Blanco M., Duvick S.A., Gardner C., Jane J. 2009. Characterization of corn grains for dry-grind ethanol production. *Journal of ASTM International* 7(2):1-10.
277. Srichuwong S., Gutesa J., Blanco M., Duvick S.A., Gardner C. 2010. Characterisation of corn grains for dry-grind ethanol production. *Journal of ASTM International*. Vol. 7, No. 2 ID JAI102568, [Online]: www.astm.org (11.01.2013)
278. Statistički godišnjak Republike Srbije (STAT. GOD. SRB. 2011), Republički zavod za statistiku, Beograd, Milana Rakića 5, 2011.

279. Stein H.H., Shurson G.C. 2009. Board invited review: The use and application of distillers dried grains with solubles (DDGS) in swine diets. *Journal of Animal Science* 87:1292-1303.
280. Stein H.H. 2007. Distillers dried grains with solubles (DDGS) in diets fed to swine. Swine focus #001, Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign.
281. Stojaković S. 2001. Optimizacija uslova alkoholnog vrenja hidrolizata kukuruznog skroba. Magistarski rad. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
282. Stojanović O., Stojanović N. 2000. Hemija ugljenih hidrata, Univerzitetska štampa, Beograd.
283. Stojanović S., Nikšić M. 2000. Tehnološka mikrobiologija biljnih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
284. St. Pierre N.R., Threan C.S., Harvey W.R. 1987. Minimum cost nutrient requirements from a growth response function. *Journal of Animal Science* 64:312-327.
285. Sues A., Millati R., Edebo L., Taherzadeh M.J. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research* 5:669–676.
286. Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1–11.
287. Swanston J.S., Smith P.L., Agu R.C., Brosnan J.M., Bringham T.A., Jack F.R. 2012. Variation across environments within the UK in grain protein and grain hardness in wheat varieties of differing distilling quality. *Field Crops Research* 127:146–152.
288. Swanston J.S., Smith P.L., Gillespie T.L., Brosnan J.M., Bringham T.A., Agu R.C. 2007. Association between grain characters and alcohol yield among soft wheat varieties. *Journal of Science of Food and Agriculture* 87:676–683.
289. Ševković N., Sinovec Z., Sinovec S. 1996. Značaj kontrole kvaliteta stočne hrane. Simpozijum tehnologije stočne hrane, Budva 4 – 7. jun 1996. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
290. Taheripour F., Hertel T.W., Tyner W.E., Beckman J.F., Birur D.K. 2008. Biofuels and their byproducts: Global economic and environmental implications, Paper presented at the American Agricultural Economics Association Meeting, Orlando, FL.
291. Tasić M.B., Veljković V.B., Banković-Ilić I.B., Lazić M.L., Mojović L.V. 2006. Bioetanol – stanje i perspektive. *Hemijska industrija* 60:1–10.

292. Terzić D., Radosavljević M., Žilić S., Milašinović M., Semenčenko V. 2010. Quality parameters of ZP hybrids biomass. *Biotechnology in Animal Husbandry* 26:491–497.
293. Tester R.F., South J.B., Morrison W.R., Ellis R.P., Piggott J.R., Batts G.R., Wheeler T.R., Lu T., Jane J., Keeling P. L., Singletary G. W. 1996. Corn fine structures affected by ear developmental temperature. *Carbohydrate Research* 282: 157-170.
294. Tester R.F., Karkalas J. 2004.a Starch - composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39(2):151-165.
295. Tester R.F., Karkalas J., Qi X. 2004. Starch structure and digestibility. Enzyme-substrate relationship. *World Poultry Science Journal* 60(2):186–195.
296. Textor S.D., Hill G.A., Macdonald D.G., Denis E.S. 1998. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 76:87-93.
297. Thatipamala R., Hill G., Rohani S. 1996. On-line state estimation and adaptive optimization using state equations for continuous production of bioethanol. *Journal of Biotechnology* 48:179-190.
298. Thoma S., Resch A., Voelz L. 1998. Pervaporation.
[Online]:<http://www.calpoly.edu/~ceenve/enve/jsczechowski/enve436/projects/Pervap/pervaporation.html> (01.03.2013)
299. Thomas K.C., Hynes S.J., Ingledew W.M. 1996. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation, *Review. Process Biochemistry* 31:321-331.
300. Thompson D.B. 2000. On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydrates Polymers* 43: 223–239.
301. Tokgoz S., Elobeid A., Fabiosa J., Hayes D., Babcock B., Yu T. et al. 2007. Emerging biofuels: Outlook of effects on U.S. grain, oilseed, and livestock markets (Staff Report 07-SR-101), Ames IA: Iowa State University, Department of Economics.
302. Tyner W.E. 2007. Policy alternatives for the future biofuels industry, *J. Agr. Food Ind. Organ.* 5(2), Article 2.
303. Tyner W.E., Taheripour F. 2007. Renewable energy policy alternatives for the future. *American Journal of Agricultural Economics* 89:1303-1310.
304. Urbanchuk, J. M. 2011. Contribution of the ethanol industry to the economy of the United States. Report prepared for the Renewable Fuel Association. [Online]:

<http://ethanolrfa.org/page/Ethanol%20Economic%20Contribution%202010%20Final%20Revised%20010411.pdf?nocdn=1>. (05.03.2013)

305. U.S. Environmental Protection Agency - EPA. 2000. SO₂ - How Sulfur Dioxide Affects the Way We Live and Breathe Office of Air Quality Planning and Standards.

306. U.S. Department of Energy. 2013. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, AlternativeFuelsDataCenter. [Online]:

<http://www.afdc.energy.gov/fuels/properties.html> (05.03.2013)

307. US Grains Council, DDGS User Handbook. 3rd Edition. 2012. [Online]: Dostupno na stranici: <http://www.grains.org/index.php/buying-selling/ddgs-user-handbook> (22.12.2012)

308. US Grains Council. 2011. DDGS User Handbook 2nd Edition, Nutrient composition of DDGS. [Online]: <http://www.grains.org/index.php/buying-selling/ddgs-user-handbook> (29.12.2011)

309. Van der Veen M.E., Veelaert S., Van der Goot A.J., Boom R.M. 2006. Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design. Journal of Food Engineering 75:176-186.

310. Van Soest P.J. 1963. Uses of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method of fiber and lignin. Journal of the Association of Agricultural Chemists 46:829-835.

311. Van Soest P.J., Wine R.H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. Journal of Association of Official Analytical Chemists 50:50-55.

312. Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74:3583-3597.

313. Vasanthan T., Yeung J., Hoover R. 2001. Dextrinization of starch in barley flours with thermostable alpha-amylase by extrusion cooking. Starch/Stärke 53:616-622.

314. Veličković D. 2000. Osnovi biohemije. Univerzitetska štampa. Beograd.

315. Wahjudi J., Xu L., Wang P., Singh V., Buriak P. Rausch K.D., Rausch K.D., McAloon A.J., Thumbleson M.E., Eckoff S.R. 2000. Quick fiber process: effect of mash temperature, dry solids, and residual germ on fiber yield and purity. Cereal Chemistry 77(9):640-644.

316. Wall J. S., James C., Donaldson G. L. 1975. Corn proteins: Chemical and physical changes during drying of grain. *Cereal Chemistry* 52:779-790.
317. Wang M. 2000. Greet 1.5a – transportation fuel-cycle model, Illinois, USA: Argonne National Laboratory. [Online]: <http://www.transportation.anl.gov/software/GREET/index.html>. (22.02.2012)
318. Wang. P., Singh V., Xu L., Johnson D.B., Rausch K.D., Tumbleson M.E. 2005. Comparison of enzymatic (E-Mill) and conventional dry-grind corn processes using a granular starch hydrolyzing enzyme. *Cereal Chemistry* 82:734-748.
319. Wester T.J., Gramlich S.M., Britton R.A., Stock R.A. 1992. Effect of grain sorghum by hybrid on in vitro rate of starch disappearance and finishing performance of ruminants. *Journal of Animal Science* 70:2866-2876.
320. Westgata P.J., Ladisch M.R. 1993. Sorption on organics and water on starch. *Industrial and Engineering Chemistry research* 32:1676-1680.
321. Westcott P.C. 2007. Ethanol expansion in the United States: How will the agricultural sector adjust? (FDS-07d-01), WashingtonDC: United States Department of Agriculture.
322. Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschal E.F. 1984. *Starch: Chemistry and Technology*. ed. Academic Press. Inc. London Ltd.
323. White P.J, Johnson L.A. (Eds) 2003. *Corn: Chemistry and Technology*, Second Edition, St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
324. Williams V. R., Wu W. T., Ysai H. Y., Bates H. G. 1958. Varietal differences in amylose content of rice starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6:47-48.
325. Wu X., Zhao R., Wang D., Bean S.R., Seib P.A., Tunistra M.R., Campbell M., O'Brien A. 2006. Effects of amylose, corn protein, and corn fiber contents on production of ethanol from starch-rich media, *Cereal Chemistry* 83(5):569-575.
326. Wyman C.E. 1996. *Handbook of bioethanol*. Taylor and Francis.
327. Xu Q., Singh A., Himmel M.E. 2009. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology* 20:364–371.
328. Xu T.J., Zhao X.Q., Bai F.W. 2005. Continuous ethanol production using self flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme and Microbial Technology* 37:634-640.

329. Yankov D., Dobрева E., Beschkov V., Emanuilova E. 1986. Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology* 8:665-667.
330. Yoosin S., Sorapipatana C. 2007. A study of ethanol production cost for gasoline substitution in Thailand and its competitiveness. *Thammasat International Journal of Science and Technology* 12:69–80.
331. Zhan X., Wang D., Tuinstra M.R., Bean S., Seib P.A., Sun X.S. 2003. Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location. *Industrial Crops and Products* 18:245-255.
332. Zhang B.S. 2006. Process for preparing fuel ethanol by using straw fiber materials, Patent CN1880416
333. Zhang Y-H. P., Lynd L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems, *Biotechnology and Bioengineering* 8:797–824.
334. Zheng X., Wang S.S. 1994. Shear induced starch conversion during extrusion. *Journal of Food Science* 59:1137-1143.

PRILOG

TABLICA I
Određivanje sadržaja etanola u smeši etanol-voda
iz gustine na 20°C-
-po K.Rauscher-u i J. Voigt-u

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm ³		%	zapreminski %	g u 100 cm ³
0,9999	0,06	0,07	0,05	0,9959	2,22	2,80	2,21
8	0,11	0,13	0,11	8	2,28	2,88	2,27
7	0,16	0,20	0,16	7	2,34	2,95	2,33
6	0,21	0,27	0,21	6	2,40	3,02	2,38
5	0,27	0,34	0,27	5	2,45	3,09	2,44
4	0,32	0,40	0,32	4	2,50	3,16	2,49
3	0,37	0,47	0,37	3	2,56	3,23	2,55
2	0,43	0,54	0,43	2	2,62	3,30	2,61
1	0,48	0,61	0,48	1	2,68	3,37	2,66
0	0,53	0,67	0,53	0	2,73	3,44	2,72
0,9989	0,59	0,74	0,58	0,9949	2,79	3,52	2,78
8	0,64	0,81	0,64	8	2,85	3,59	2,83
7	0,70	0,88	0,69	7	2,91	3,66	2,89
6	0,75	0,94	0,74	6	2,97	3,73	2,94
5	0,80	1,01	0,80	5	3,02	3,80	3,00
4	0,86	1,08	0,85	4	3,08	3,87	3,06
3	0,91	1,15	0,90	3	3,14	3,95	3,12
2	0,96	1,21	0,96	2	3,20	4,02	3,17
1	1,01	1,28	1,01	1	3,26	4,10	3,23
0	1,07	1,35	1,06	0	3,32	4,17	3,29
0,9979	1,13	1,42	1,12	0,9939	3,37	4,24	3,35
8	1,18	1,49	1,17	8	3,43	4,32	3,41
7	1,24	1,56	1,23	7	3,49	4,39	3,47
6	1,29	1,62	1,28	6	3,55	4,47	3,52
5	1,34	1,69	1,34	5	3,61	4,54	3,58
4	1,40	1,76	1,39	4	3,67	4,62	3,64
3	1,45	1,83	1,45	3	3,73	4,69	3,70
2	1,51	1,90	1,50	2	3,79	4,76	3,76
1	1,56	1,97	1,55	1	3,85	4,84	3,82
0	1,62	2,04	1,61	0	3,91	4,91	3,87
0,9969	1,67	2,11	1,66	0,9929	3,97	4,99	3,93
8	1,73	2,18	1,72	8	4,03	5,06	3,99
7	1,78	2,24	1,77	7	4,09	5,14	4,14
6	1,83	2,31	1,83	6	4,15	5,21	4,11
5	1,89	2,38	1,88	5	4,21	5,29	4,17
4	1,94	2,45	1,94	4	4,27	5,36	4,23
3	2,00	2,52	1,99	3	4,34	5,44	4,29
2	2,06	2,59	2,05	2	4,40	5,51	4,35
1	2,11	2,66	2,10	1	4,46	5,59	4,41
0	2,17	2,73	2,16	0	4,52	5,67	4,47

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm ³		%	zaprem. %	g u 100 cm ³
0,9919	4,58	5,74	4,53	0,9879	7,11	8,88	7,01
8	4,64	5,82	4,59	8	7,18	8,96	7,07
7	4,70	5,89	4,65	7	7,25	9,05	7,14
6	4,76	5,97	4,71	6	7,31	9,13	7,20
5	4,82	6,04	4,77	5	7,38	9,21	7,27
4	4,88	6,12	4,83	4	7,44	9,29	7,27
3	4,94	6,19	4,89	3	7,51	9,37	7,40
2	5,00	6,27	4,95	2	7,58	9,46	7,46
1	5,07	6,35	5,01	1	7,64	9,54	7,53
0	5,13	5,74	5,00	0	7,71	9,62	7,59
0,9909	5,19	6,50	5,13	0,9869	7,77	9,70	7,66
8	5,25	6,58	5,19	8	7,84	9,78	7,72
7	5,32	6,66	5,26	7	7,91	9,87	7,79
6	5,38	6,74	5,32	6	7,98	9,95	7,85
5	5,44	6,81	5,38	5	8,04	10,03	7,92
4	5,50	6,89	5,44	4	8,11	10,11	7,99
3	5,56	6,97	5,50	3	8,18	10,20	8,05
2	5,62	7,05	5,56	2	8,24	10,28	8,12
1	5,68	7,12	5,62	1	8,31	10,37	8,19
0	5,75	7,20	5,68	0	8,38	10,45	8,25
0,9899	5,82	7,28	5,75	0,9859	8,45	10,54	8,32
8	5,88	7,36	5,81	8	8,52	10,62	8,39
7	5,94	7,43	5,87	7	8,59	10,71	8,45
6	6,00	7,51	5,93	6	8,66	10,79	8,52
5	6,07	7,59	5,99	5	8,73	10,88	8,59
4	6,13	7,67	6,05	4	8,80	10,96	8,65
3	6,20	7,75	6,12	3	8,87	11,05	8,72
2	6,26	7,83	6,18	2	8,94	11,13	8,79
1	6,32	7,91	6,24	1	9,01	11,22	8,85
0	6,39	7,99	6,31	0	9,08	11,30	8,92
0,9889	6,45	8,07	6,37	0,9849	9,15	11,39	8,99
8	6,52	8,15	6,43	8	9,21	11,47	9,06
7	6,59	8,24	6,50	7	9,28	11,56	9,12
6	6,66	8,32	6,56	6	9,35	11,64	9,19
5	6,72	8,40	6,62	5	9,42	11,73	9,26
4	6,78	8,48	6,69	4	9,49	11,81	9,33
3	6,85	8,56	6,75	3	9,56	11,90	9,40
2	6,91	8,64	6,81	2	9,63	11,99	9,46
1	6,98	8,72	6,88	1	9,70	12,07	9,53
0	7,04	8,80	6,94	0	9,77	12,16	9,60

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm ³		%	zaprem. %	g u 100 cm ³
0,9839	9,84	12,24	9,67	0,9799	12,77	15,84	12,50
8	9,91	12,33	9,73	8	12,86	15,93	12,58
7	9,98	12,41	9,80	7	12,93	16,02	12,65
6	10,05	12,50	9,87	6	13,01	16,11	12,72
5	10,12	12,59	9,94	5	13,08	16,20	12,79
4	10,20	12,68	10,01	4	13,16	16,30	12,87
3	10,27	12,77	10,08	3	13,24	16,39	12,94
2	10,34	12,86	10,15	2	13,31	16,48	13,01
1	10,42	12,95	10,22	1	13,39	16,58	13,09
0	10,49	13,04	10,29	0	13,47	16,67	13,16
0,9829	10,56	13,13	10,36	0,9789	13,54	16,76	13,23
8	10,63	13,21	10,43	8	13,61	16,85	13,20
7	10,70	13,30	10,50	7	13,69	16,95	13,38
6	10,78	13,39	10,57	6	13,77	17,04	13,45
5	10,85	13,48	10,64	5	13,84	17,13	13,45
4	10,93	13,57	10,71	4	13,92	17,23	13,60
3	11,00	13,66	10,78	3	14,00	17,32	13,67
2	11,08	13,75	10,85	2	14,08	17,41	13,74
1	11,15	13,84	10,92	1	14,16	17,51	13,82
0	11,22	13,93	10,99	0	14,23	17,60	13,89
0,9819	11,29	14,02	11,06	0,9779	14,31	17,70	13,97
8	11,37	14,11	11,14	8	14,39	17,79	14,04
7	11,44	14,20	11,21	7	14,46	17,88	14,12
6	11,51	14,29	11,28	6	14,54	17,98	14,19
5	11,59	14,38	11,35	5	14,62	18,07	14,27
4	11,66	14,47	11,42	4	14,69	18,16	14,34
3	11,73	14,56	11,49	3	14,77	18,26	14,42
2	11,81	14,65	11,57	2	14,85	18,35	14,49
1	11,88	14,74	11,64	1	14,93	18,45	14,57
0	11,95	14,83	11,71	0	15,01	18,54	14,64
0,9809	12,03	14,92	11,78	0,9769	15,08	18,63	14,71
8	12,10	15,01	11,85	8	15,16	18,73	14,79
7	12,18	15,10	11,92	7	15,24	18,82	14,86
6	12,25	15,19	12,00	6	15,32	18,91	14,93
5	12,33	15,29	12,07	5	15,40	19,01	15,01
4	12,41	15,38	12,14	4	15,47	19,10	15,08
3	12,48	15,47	12,21	3	15,54	19,19	15,15
2	12,55	15,56	12,29	2	15,62	19,28	15,22
1	12,63	15,65	12,36	1	15,70	19,38	15,30
0	12,70	15,74	12,43	0	15,78	19,47	15,37

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm ³		%	zaprem. %	g u 100 cm ³
0,9759	15,85	19,56	15,44	0,9719	18,91	23,24	18,35
8	15,93	19,66	15,52	8	18,98	23,33	18,42
7	16,01	19,75	15,59	7	19,06	23,42	18,49
6	16,08	19,84	15,66	6	19,14	23,51	18,56
5	16,16	19,93	15,74	5	19,21	23,60	18,63
4	16,23	20,02	15,81	4	19,29	23,69	18,70
3	16,31	20,12	15,88	3	19,36	23,78	18,77
2	16,39	20,21	15,96	2	19,44	23,87	18,84
1	16,46	20,30	16,03	1	19,51	23,96	18,91
0	16,54	20,39	16,10	0	19,58	24,04	18,98
0,9749	16,61	20,48	16,16	0,9709	19,66	24,13	19,05
8	16,69	20,57	16,25	8	19,73	24,22	19,12
7	16,77	20,67	16,32	7	19,81	24,31	19,19
6	16,85	20,76	16,39	6	19,88	24,40	19,26
5	16,92	20,85	16,47	5	19,96	24,49	19,33
4	16,99	20,94	16,54	4	20,03	24,58	19,40
3	17,07	21,03	16,61	3	20,11	24,67	19,47
2	17,15	21,13	16,68	2	20,18	24,75	19,54
1	17,23	21,22	16,76	1	20,25	24,84	19,61
0	17,30	21,31	16,83	0	20,32	24,93	19,68
0,9739	17,38	21,41	16,90	0,9699	20,40	25,02	19,75
8	17,46	21,50	16,97	8	20,47	25,10	19,82
7	17,53	21,59	17,05	7	20,54	25,19	19,89
6	17,61	21,68	17,12	6	20,62	25,28	19,95
5	17,69	21,78	17,19	5	20,69	25,36	20,02
4	17,77	21,87	17,26	4	20,76	25,45	20,09
3	17,84	21,96	17,34	3	20,84	25,54	20,16
2	17,93	22,06	17,41	2	20,91	25,63	20,23
1	18,00	22,15	17,48	1	20,98	25,71	20,30
0	18,08	22,24	17,55	0	21,06	25,80	20,37
0,9729	18,15	22,33	17,62	0,9689	21,13	25,89	20,44
8	18,23	22,42	17,70	8	21,20	25,97	20,50
7	18,30	22,51	17,77	7	21,27	26,06	20,57
6	18,38	22,60	17,84	6	21,34	26,14	20,64
5	18,45	22,69	17,91	5	21,42	26,23	20,71
4	18,53	22,78	17,98	4	21,49	26,31	20,77
3	18,61	22,88	18,06	3	21,56	26,40	20,84
2	18,68	22,97	18,13	2	21,63	26,48	20,91
1	18,76	23,06	18,20	1	21,70	26,57	20,97
0	18,83	23,15	18,27	0	21,77	26,65	21,04

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm ³		%	zaprem. %	g u 100 cm ³
0,9679	21,85	26,74	21,11	0,9639	24,63	30,02	23,70
8	21,92	26,82	21,18	8	24,70	30,10	23,76
7	21,99	26,91	21,24	7	24,77	30,18	23,83
6	22,06	26,99	21,31	6	24,83	30,26	23,89
5	22,13	27,07	21,38	5	24,90	30,34	23,95
4	22,20	27,16	21,44	4	24,97	30,42	24,02
3	22,27	27,24	21,51	3	25,04	30,50	24,08
2	22,34	27,32	21,57	2	25,11	30,58	24,14
1	22,41	27,41	21,64	1	25,17	30,65	24,20
0	22,48	27,49	21,70	0	25,23	30,73	24,26
0,9669	22,55	27,57	21,77	0,9629	25,30	30,81	24,32
8	22,62	27,66	21,84	8	25,37	30,89	24,38
7	22,69	27,74	21,90	7	25,43	30,96	24,44
6	22,77	27,83	21,97	6	25,50	31,04	24,50
5	22,84	27,91	22,03	5	25,57	31,12	24,57
4	22,91	27,99	22,10	4	25,64	31,20	24,63
3	22,98	28,08	22,16	3	25,70	31,27	24,69
2	23,05	28,16	22,23	2	25,77	31,35	24,75
1	23,12	28,24	22,29	1	25,83	31,43	24,81
0	23,19	28,32	22,36	0	25,90	31,51	24,87
0,9659	23,26	28,41	22,42	0,9619	25,96	31,58	24,93
8	23,33	28,49	22,49	8	26,03	31,66	24,99
7	23,40	28,57	22,55	7	26,09	31,73	25,05
6	23,46	28,65	22,62	6	26,16	31,81	25,11
5	23,53	28,73	22,68	5	26,22	31,88	25,17
4	23,60	28,82	22,74	4	26,29	31,96	25,23
3	23,67	28,90	22,81	3	26,35	32,03	25,28
2	23,74	28,98	22,87	2	26,42	32,11	25,34
1	23,81	29,06	22,94	1	26,48	32,18	25,40
0	23,88	29,15	23,00	0	26,55	32,26	25,46
0,9649	23,95	29,23	23,07	0,9609	26,61	32,33	25,52
8	24,02	29,31	23,13	8	26,67	32,40	25,58
7	24,09	29,39	23,19	7	26,74	32,48	25,64
6	24,16	29,47	23,26	6	26,80	32,55	25,70
5	24,23	29,55	23,32	5	26,86	32,63	25,75
4	24,30	29,63	23,38	4	26,92	32,70	25,81
3	24,36	29,71	23,45	3	26,99	32,78	25,87
2	24,43	29,79	23,51	2	27,05	32,85	25,93
1	24,50	29,87	23,57	1	27,12	32,92	25,99
0	24,56	29,94	23,64	0	27,18	33,00	26,05

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zaprem. %	g u 100 cm ³		%	zaprem. %	g u 100 cm ³
0,9599	27,24	33,07	26,10	0,9559	29,72	35,92	28,36
8	27,30	33,14	26,16	8	29,78	35,99	28,41
7	27,37	33,22	26,22	7	29,84	36,06	28,47
6	27,43	33,29	26,28	6	29,90	36,13	28,52
5	27,50	33,36	26,34	5	29,96	36,20	28,58
4	27,56	33,44	26,39	4	30,02	36,27	28,63
3	27,62	33,51	26,45	3	30,08	36,34	28,68
2	27,68	33,58	26,51	2	30,14	36,40	28,74
1	27,75	33,66	26,57	1	30,20	36,47	28,79
0	27,81	33,73	26,63	0	30,26	36,54	28,84
0,9589	27,87	33,80	26,68	0,9549	30,32	36,61	28,89
8	27,94	33,88	26,74	8	30,37	36,67	28,95
7	28,00	33,95	26,80	7	30,43	36,74	29,00
6	28,06	34,02	26,86	6	30,49	36,81	29,05
5	28,13	34,09	26,91	5	30,55	36,87	29,11
4	28,19	34,16	26,97	4	30,61	36,94	29,16
3	28,25	34,23	27,02	3	30,67	37,01	29,21
2	28,32	34,31	27,08	2	30,72	37,07	29,27
1	28,38	34,38	27,14	1	30,78	37,14	29,32
0	28,44	34,45	27,19	0	30,84	37,21	29,37
0,9579	28,50	34,52	27,25	0,9539	30,90	37,28	29,42
8	28,56	34,59	27,30	8	30,96	37,34	29,48
7	28,62	34,66	27,36	7	31,02	37,41	29,53
6	28,68	34,73	27,41	6	31,08	37,48	29,58
5	28,74	34,80	27,47	5	31,13	37,54	29,63
4	28,81	34,88	27,53	4	31,19	37,61	29,69
3	28,87	34,95	27,58	3	31,25	37,67	29,74
2	28,93	35,02	27,64	2	31,31	37,74	29,79
1	28,99	35,09	27,69	1	31,36	37,80	29,84
0	29,05	35,16	27,75	0	31,42	37,87	29,90
0,9569	29,11	35,23	27,81	0,9529	31,48	37,93	29,95
8	29,15	35,30	27,86	8	31,54	38,00	30,00
7	29,23	35,37	27,92	7	31,60	38,07	30,03
6	29,30	35,44	27,93	6	31,65	38,13	30,10
5	29,36	35,51	28,03	5	31,71	38,20	30,16
4	29,42	35,58	28,08	4	31,77	38,26	30,21
3	29,48	35,65	28,14	3	31,83	38,33	30,26
2	29,54	35,72	28,19	2	31,88	38,39	30,31
1	29,60	35,78	28,25	1	31,94	38,46	30,37
0	29,66	35,85	28,30	0	32,00	38,52	30,42

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm ³		%	zapreminski %	g u 100 cm ³
0,9519	32,06	38,59	30,47	0,9479	34,28	41,09	32,44
8	32,11	38,65	30,52	8	34,33	41,15	32,48
7	32,17	38,72	30,57	7	34,39	41,21	32,53
6	32,23	38,78	30,62	6	34,44	41,27	32,58
5	32,38	38,84	30,67	5	34,49	41,33	32,63
4	32,34	38,91	30,72	4	34,55	41,39	32,67
3	32,39	38,97	30,77	3	34,60	41,45	32,72
2	32,45	39,03	30,82	2	34,66	41,51	32,77
1	32,51	39,10	30,87	1	34,71	41,57	32,82
0	32,57	39,16	30,91	0	34,76	41,63	32,86
0,9509	32,63	39,23	30,96	0,9469	34,82	41,69	32,91
8	32,68	39,29	31,01	8	34,87	41,75	32,96
7	32,73	39,35	31,06	7	34,92	41,81	33,01
6	32,79	39,42	31,11	6	34,98	41,87	33,05
5	32,85	39,48	31,16	5	35,03	41,93	33,10
4	32,90	39,54	31,21	4	35,09	41,99	33,15
3	32,96	39,61	31,26	3	35,14	42,05	33,19
2	33,01	39,67	31,31	2	35,19	42,11	33,24
1	33,07	39,73	31,36	1	35,24	42,16	33,29
0	33,12	39,79	31,41	0	35,29	42,22	33,33
0,9499	33,18	39,86	31,46	0,9459	35,35	42,28	33,38
8	33,24	39,92	31,51	8	35,40	42,34	33,42
7	33,29	39,98	31,56	7	35,45	42,40	33,47
6	33,35	40,04	31,61	6	35,51	42,46	33,52
5	33,41	40,11	31,66	5	35,56	42,51	33,56
4	33,46	40,17	31,71	4	35,61	42,57	33,61
3	33,52	40,23	31,75	3	35,66	42,63	33,66
2	33,57	40,29	31,80	2	35,72	42,69	33,70
1	33,62	40,35	31,85	1	35,77	42,75	33,75
0	33,68	40,42	31,90	0	35,82	42,81	33,79
0,9489	33,73	40,48	31,95	0,9459	35,87	42,86	33,84
8	33,79	40,54	32,00	8	35,93	42,92	33,89
7	33,84	40,60	32,05	7	35,98	42,98	33,93
6	33,90	40,67	32,10	6	36,03	43,04	33,98
5	33,96	40,73	32,15	5	36,08	43,10	34,03
4	34,01	40,79	32,30	4	36,14	43,16	34,07
3	34,06	40,85	32,35	3	36,19	43,22	34,12
2	34,12	40,91	32,29	2	36,24	43,27	34,27
1	34,17	40,97	32,34	1	36,29	43,33	34,21
0	34,23	41,03	32,39	0	36,35	43,39	34,25

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm ³		%	zapreminski %	g u 100 cm ³
0,9439	36,40	43,45	34,30	0,9399	38,46	45,71	36,08
8	36,46	43,51	34,35	8	38,51	45,77	36,13
7	36,51	43,57	34,39	7	38,56	45,82	36,17
6	36,56	43,62	34,44	6	38,61	45,88	36,21
5	36,61	43,68	34,48	5	38,66	45,93	36,26
4	36,66	43,74	34,53	4	38,71	45,99	36,30
3	36,72	43,80	34,58	3	38,76	46,04	36,34
2	36,77	43,86	34,62	2	38,81	46,10	36,39
1	36,83	43,92	34,67	1	38,86	46,15	36,43
0	36,88	43,97	34,71	0	38,92	46,21	36,47
0,9429	36,93	44,03	34,76	0,9389	38,97	46,26	36,52
8	36,98	44,09	34,80	8	39,02	46,32	36,56
7	37,03	44,15	34,85	7	39,07	46,37	36,60
6	37,09	44,21	34,89	6	39,12	46,43	36,64
5	37,14	44,26	34,94	5	39,17	46,48	36,69
4	37,19	44,32	34,98	4	39,22	46,54	36,73
3	37,24	44,37	35,03	3	39,27	46,59	36,80
2	37,29	44,43	35,07	2	39,32	46,64	36,81
1	37,34	44,48	35,12	1	39,37	46,70	36,86
0	37,39	44,54	35,16	0	39,42	46,75	36,90
0,9419	37,44	44,60	35,20	0,9379	39,47	46,80	36,94
8	37,49	44,65	35,25	8	39,52	46,86	36,98
7	37,54	44,71	35,29	7	39,57	46,91	37,03
6	37,59	44,76	35,34	6	39,62	46,97	37,05
5	37,65	44,82	35,38	5	39,66	47,02	37,11
4	37,70	44,88	35,42	4	39,71	47,07	37,15
3	37,75	44,93	35,46	3	39,76	47,13	37,20
2	37,80	44,99	35,50	2	39,81	47,18	37,24
1	37,85	45,04	35,55	1	39,86	47,23	37,28
0	37,90	45,10	35,60	0	39,91	47,29	37,32
0,9409	37,95	45,15	35,65	0,9369	39,96	47,34	37,37
8	38,00	45,21	35,69	8	40,01	47,40	37,41
7	38,05	45,27	35,73	7	40,06	47,45	37,45
6	38,10	45,32	35,78	6	40,10	47,50	37,49
5	38,15	45,38	35,82	5	40,15	47,56	37,53
4	38,20	45,43	35,86	4	40,20	47,61	37,58
3	38,25	45,49	35,91	3	40,25	47,66	37,62
2	38,30	45,54	35,95	2	40,30	47,71	37,66
1	38,35	45,60	35,99	1	40,35	47,77	37,70
0	38,40	45,65	36,04	0	40,40	47,82	37,74

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm ³		%	zapreminski %	g u 100 cm ³
0,9359	40,45	47,87	37,79	0,9319	42,39	49,95	39,43
8	40,49	47,92	37,83	8	42,43	50,00	39,47
7	40,54	47,98	37,87	7	42,48	50,05	39,51
6	40,59	48,03	37,91	6	42,53	50,11	39,56
5	40,64	48,08	37,95	5	42,58	50,16	39,60
4	40,69	48,13	38,00	4	42,63	50,21	39,64
3	40,74	48,19	38,04	3	42,68	50,26	39,68
2	40,79	48,24	38,08	2	42,72	50,31	39,72
1	40,84	48,29	38,12	1	42,77	50,36	39,76
0	40,89	48,34	38,16	0	42,82	50,41	39,80
0,9349	40,94	48,40	38,21	0,9309	42,87	50,47	39,84
8	40,99	48,45	38,25	8	42,92	50,52	39,88
7	41,03	48,50	38,29	7	42,97	50,57	39,92
6	41,08	48,55	38,33	6	43,01	50,62	39,96
5	41,13	48,60	38,37	5	43,06	50,67	40,00
4	41,18	48,66	38,41	4	43,11	50,72	40,04
3	41,23	48,71	38,45	3	43,15	50,77	40,08
2	41,27	48,76	38,50	2	43,20	50,82	40,12
1	41,32	48,81	38,54	1	43,25	50,87	40,16
0	41,37	48,86	38,58	0	43,30	50,92	40,20
0,9339	41,42	48,92	38,62	0,9299	43,34	50,97	40,24
8	41,47	48,97	38,66	8	43,39	51,02	40,28
7	41,52	49,02	38,70	7	43,44	51,07	40,32
6	41,56	49,07	38,74	6	43,49	51,12	40,36
5	41,61	49,12	38,78	5	43,54	51,18	40,40
4	41,66	49,18	38,82	4	43,59	51,23	40,44
3	41,71	49,23	38,86	3	43,64	51,28	40,48
2	41,76	49,28	38,91	2	43,68	51,33	40,52
1	41,80	49,33	38,95	1	43,73	51,38	40,56
0	41,85	49,38	38,99	0	43,78	51,43	40,60
0,9329	41,90	49,44	39,03	0,9289	43,82	51,48	40,64
8	41,95	49,49	39,07	8	43,87	51,53	40,68
7	42,00	49,54	39,11	7	43,92	51,58	40,72
6	42,05	49,59	39,15	6	43,97	51,63	40,76
5	42,09	49,64	39,19	5	44,01	51,68	40,80
4	42,14	49,69	39,23	4	44,06	51,73	40,84
3	42,19	49,75	39,27	3	44,11	51,78	40,88
2	42,24	49,80	39,31	2	44,16	51,83	40,92
1	42,29	49,85	39,35	1	44,20	51,88	40,96
0	42,34	49,90	39,39	0	44,25	51,93	40,99

ρ	Etanol			ρ	Etanol		
	%	zapreminski %	g u 100 cm ³		%	zapreminski %	g u 100 cm ³
0,9279	44,30	51,98	41,03	0,9239	46,15	53,92	42,56
8	44,35	252,03	41,07	8	46,20	53,97	42,60
7	44,39	52,08	41,11	7	46,24	54,02	42,64
6	44,44	52,13	41,15	6	46,29	54,07	42,68
5	44,49	52,18	41,19	5	46,33	54,11	42,71
4	44,53	52,23	41,23	4	46,38	54,16	42,75
3	44,57	52,27	41,26	3	46,43	54,21	42,79
2	44,62	52,32	41,30	2	46,47	54,26	42,83
1	44,67	52,37	41,34	1	46,52	54,31	42,87
0	44,71	52,42	41,38	0	46,56	54,35	42,90
0,9269	44,76	52,47	41,42	0,9229	46,61	54,40	42,94
8	44,81	52,52	41,46	8	46,66	54,45	42,98
7	44,86	52,57	41,50	7	46,71	54,50	43,02
6	44,91	52,62	41,54	6	46,75	54,54	43,05
5	44,95	52,67	41,57	5	46,80	54,59	43,09
4	45,00	52,72	41,61	4	46,84	54,64	43,13
3	45,05	52,77	41,65	3	46,89	54,69	43,17
2	45,10	52,82	41,69	2	46,93	54,73	43,20
1	45,14	52,87	41,73	1	46,98	54,78	43,24
0	45,18	52,91	41,76	0	47,03	54,83	43,28
0,9259	45,23	52,96	41,80	0,9219	47,07	54,88	43,32
8	45,28	53,01	41,84	8	47,11	54,92	43,35
7	45,32	53,06	41,88	7	47,16	54,97	43,39
6	45,37	53,11	41,92	6	47,21	55,02	43,43
5	45,41	53,15	41,95	5	47,26	55,07	43,47
4	45,46	53,20	41,99	4	47,30	55,11	43,50
3	45,51	53,25	42,03	3	47,34	55,16	43,54
2	45,56	53,30	42,07	2	47,39	55,21	43,58
1	45,60	53,35	42,11	1	47,44	55,26	43,62
0	45,65	53,40	42,15	0	47,48	55,30	43,65
0,9249	45,69	53,44	42,18	0,9209	47,53	55,35	43,69
8	45,74	53,49	42,22	8	47,58	55,40	43,73
7	45,78	53,54	42,26	7	47,62	55,44	43,76
6	45,83	53,59	42,30	6	47,66	55,49	43,80
5	45,88	53,64	42,34	5	47,71	55,54	43,84
4	45,92	53,68	42,37	4	47,76	55,59	43,88
3	45,97	53,73	42,41	3	47,80	55,63	43,91
2	46,01	53,78	42,45	2	47,85	55,68	43,95
1	46,06	53,83	42,49	1	47,89	55,73	43,99
0	46,11	53,88	42,53	0	47,94	55,78	44,03

BIOGRAFIJA AUTORA

Valentina Semenčenko, dipl. inženjer tehnologije, rođena je 11. jula 1979. godine u Beogradu. Osnovnu školu, Treću beogradsku gimnaziju kao i nižu muzičku školu završila je sa odličnim uspehom u Beogradu.

Na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu 2007. godine je diplomirala na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, a naredne 2008. godine upisala je doktorske studije.

Tokom 2008. godine bila je angažovana kao volonter-pripravnik na Odseku za tehnologiju Grupe za iskorišćavanje kukuruza, Instituta za kukuruz. Od januara 2009. do januara 2010. godine bila je zaposlena u Institutu za kukuruz kao mlađi istraživač. Bila je uključena u institutski projekat „Razvoj ZP biološki vrednih i ekološki bezbednih proizvoda“. Završila je obuku za interne proverivače HACCP sistema. Eksperimentalni deo istraživanja vezanih za doktorsku disertaciju realizovala je najvećim delom u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“.

U dosadašnjem naučno-istraživačkom radu objavila je jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu, a prvi je autor dva rada u međunarodnim časopisima. Učestvovala je na nekoliko nacionalnih i međunarodnih konferencija i koautor je više naučnih radova. Govori, čita i piše engleski jezik, a služi se ruskim i nemačkim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Валентина Семенченко

број индекса 4021/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Испитивање различитих хибрида кукуруза као сировине за производњу
биоетанола, скроба и хране за животиње

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2013. године

Valentina Semenchenko

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Валентина Семенченко

Број индекса 4021/2008

Студијски програм Биотехнологија и биохемијско инжењерство

Наслов рада Испитивање различитих хибрида кукуруза као сировине за
производњу биоетанола, скроба и хране за животиње

Ментор др Љиљана Мојовић, редовни професор Технолошко-металуршког
факултета Универзитета у Београду

Потписани/а Валентина Семенченко

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2013. године

Valentina Semenchenko

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање различитих хибрида кукуруза као сировине за производњу биоетанола, скроба и хране за животиње

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2013. године

Valentina Semencalica

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.