

# Ekstrakcija etanola višim alkoholima u proizvodnji biogoriva iz obnovljivih izvora

---

**Moharić, Lidia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:032405>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Lidia Moharić  
870/BPI

**EKSTRAKCIJA ETANOLA VIŠIM  
ALKOHOLIMA U PROIZVODNJI  
BIOGORIVA IZ OBNOVLJIVIH  
IZVORA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr.sc. Predraga Horvata, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Antonije Trontel.

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (SPECH-LRM; šifra projekta 9158).

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### EKSTRAKCIJA ETANOLA VIŠIM ALKOHOLIMA U PROIZVODNJI BIOGORIVA IZ OBNOVLJIVIH IZVORA

*Lidia Moharić, 870/BPI*

#### Sažetak:

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti primjenu viših alkohola (pentan-1-ola, oktan-1-ola, nonan-1-ola i oleil alkohola) kao ekstraktivnih otapala s visokim vrelištem za izdvajanje etanola iz fermentirane podloge u integriranom bioreaktorskom sustavu. Ekstrakcija etanola je istraživana u svrhu dobivanja ekološki, energetski i financijski učinkovitijeg procesa od uobičajeno primijenjene višestupanjske destilacije. Istraženo je toksično djelovanje ekstraktanta na kulturu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i ponašanje dvokomponentnih (ekstraktant–voda) odnosno trokomponentnih smjesa (ekstraktant-voda-etanol) te učinkovitost razdvajanja organske faze od podloge. Izrađeni su binodalni trokomponentni dijagrami za sustave pentan-1-ol/voda/etanol, oktan-1-ol/voda/etanol, nonan-1-ol/voda/etanol i oleil alkohol/voda/etanol. Na temelju binodalnih dijagrama izvršen je proračun potrebnih količina otapala za trostupanjski ekstrakcijski sustav i predložen je sustav tehnološke linije za izdvajanje etanola iz fermentirane podloge.

**Ključne riječi:** bioetanol, ekstrakcija, obnovljive sirovine, održivost

**Rad sadrži:** 67 stranica, 45 slika, 12 tablica, 41 literaturnih navoda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof.dr.sc. Predrag Horvat

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Antonija Trontel

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
2. Prof.dr.sc. Predrag Horvat
3. Izv.prof.dr.sc. Mirjana Čurlin
4. Prof.dr.sc. Blaženka Kos (zamjena)

**Datum obrane:** 22. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

### EXTRACTION OF ETHANOL WITH HIGHER ALCOHOLS IN PRODUCTION OF BIOGAS FROM RENEWABLE SOURCES

*Lidia Moharić, 870/BPI*

#### Abstract:

The aim of this work was to investigate the application of higher alcohols characterized by high boiling points (i.e. pentan-1-ol, octan-1-ol, nonan-1-ol and oleyl alcohol) as extraction solvents for the ethanol extraction from broth, fermented in the integrated bioreactor system. The goal was the development of the ecologically, energetically and financially more efficient process than conventional multi-stage distillation. Applied extractants were tested for its toxicity on the *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture. The behaviors of two-component systems (extractant-water) and three-component mixtures (extractant-water-ethanol) were investigated toward the efficiency of separation of organic phase (extract) and the water phase (raffinate). Binodal curves were constructed for systems: pentan-1-ol / water / ethanol, octan-1-ol / water / ethanol, nonan-1-ol / water / ethanol and oleyl alcohol / water / ethanol. Binodal diagrams were used for the calculations of required solvent amounts for the ethanol extraction in the three-stage extraction system. The plants for ethanol production based on extractions with higher alcohols were proposed.

**Keywords:** bioethanol, extraction, renewable raw materials, sustainability

**Thesis contains:** 67 pages, 45 figures, 12 tables, 41 references, 2 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr.sc. Predrag Horvat

**Technical support and assistance:** dr.sc. Antonija Trontel

#### Reviewers:

1. PhD. Božidar Šantek, Full professor
2. PhD. Predrag Horvat, Full professor
3. PhD. Mirjana Čurlin, Associate professor
4. PhD. Blaženka Kos, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 22 September 2017

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Metode za izdvajanje etanola.....	2
2.1.1. Destilacija.....	2
2.1.2. Adsorpcija .....	3
2.1.3. Ozonizacija.....	3
2.1.4. Stripiranje plinom.....	3
2.1.5. Pervaporacija.....	4
2.1.6. Ekstrakcija.....	4
2.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće .....	4
2.2.1. Otapala za ekstrakciju .....	6
2.2.2. Oprema .....	11
2.3. Fermentacija na lignoceluloznim sirovinama .....	12
2.4. Mikroorganizmi .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. Mikroorganizam .....	15
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge .....	15
3.1.3. Aparatura i pribor .....	16
3.2. Metode .....	19
3.2.1. Analitičke metode .....	19
3.2.2. Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola .....	20
3.2.3. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata hranjive podloge (hidrolizat lignoceluloznog kompleksa i kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	22
3.2.4. Određivanje toksičnosti otapala na kulturu stanica kvasca .....	22
3.2.5. Ispitivanje ekstraktivnih i razdjelnih svojstava ekstraktanata u sustavu za kontinuiranu ekstrakciju .....	23
3.2.6. Izračun potrebnog broja stupnjeva ekstrakcije etanola organskim otapalima iz podloge ..	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>27</b>
4.1. Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola .....	27
4.1.1. Preliminarno istraživanje ponašanja dvokomponentnih smjesa .....	27
4.1.2. Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesa i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama .....	29

4.1.3. Ravnotežne koncentracije, razdjeljivanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese etanol-voda-organsko otapalo .....	32
4.2. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze .....	41
4.2.1. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge (voda i kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	41
4.2.2. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge (hidrolizat lignoceluloznog kompleksa i kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	42
4.3. Preliminarno istraživanje utjecaja otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol ili oleil alkohol) na rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u tikvicama na tresilici .....	45
4.4. Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju.....	48
4.5. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola .....	52
4.5.1. Izračun broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za šaržnu ekstrakciju .....	52
4.5.2. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju.....	56
4.6. Prijedlog tehnološkog rješenja.....	61
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>63</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>64</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>68</b>
7.1. Baždarni dijagrami za određivanje volumnog udjela etanola i otapala (pentan-1-ola, oktan-1-ola, nonan-1-ola i oleil alkohola).....	68
7.2. Popis kratica.....	73



## 1. UVOD

Suočeno s neminovnim iscrpljivanjem fosilnih goriva (nafte, plina, ugljena) i političko-vojnim nestabilnostima u područjima proizvodnje istih, čovječanstvo se okreće traženju alternativnih goriva i traženju novih načina iskorištavanja goriva. Moguća zamjena fosilnim gorivima su biogoriva (npr. biodizel, bioetanol, biobutanol), a primjer novih načina uporabe takvih goriva su gorivi članci (služe za neposrednu pretvorbu kemijske energije sadržane u nekom kemijskom elementu/spoju u istosmjernu električnu struju). Na žalost, biotehnoška proizvodnja biogoriva je danas tehnološki najučinkovitija ako se uporabe sirovine koje inače koristimo za proizvodnju ljudske hrane i hranidbu domaćih životinja (biljke i njihovi dijelovi koji sadrže škrob, jednostavne i/ili složene šećere, ulja). Da bi se izbjeglo korištenje takvih sirovina i mogući nedostatak hrane, istražuju se tehnološki procesi u kojima bi se kao osnovne sirovine koristili sporedni proizvodi iz proizvodnje hrane (npr. stajljike kukuruza, uljane repice, slame žitarica, masna tkiva i unutarnji organi životinja) ili otpadci iz drugih proizvodnji i svakodnevnog života (npr. usitnjeni materijali iz drvne industrije, stari papir). To pak zahtijeva uporabu postupaka djelomičnog ili potpunog razdvajanja lignoceluloznog kompleksa na sastavne biopolimere: lignin, hemicelulozu i celulozu. Kemijskom i/ili enzimskom hidrolizom mogu nastati fermentabilni šećeri, pretežito pentoze iz hemiceluloze i heksoze iz celuloza. Takvi procesi su energetske zahtjevniji od klasične proizvodnje biogoriva iz škrobnih i ugljikohidratnih sirovina, pa odnos dobivene i uložene energije po jedinici mase biogoriva proizvedenog iz lignoceluloznih sirovina biva nepovoljniji. Da bi se izbjegla ta nepovoljnost, nastoji se smanjiti potrošnja energije u procesima izolacije biogoriva iz fermentiranih komina. U klasičnoj proizvodnji bioetanola kompletna fermentirana podloga podvrgava se destilaciji. Primjeni li se ekstrakcija etanola iz podloge hidrofobnim otapalom s višim vrelištem, može se destilaciji (ili pervaporaciji) podvrgnuti ekstrakt. Kako ekstrakt ima znatno manji volumen (i manju masu!) od kompletne podloge, potrebno je manje energije za njegovu destilaciju nego za destilaciju kompletne podloge. Sukladno navedenom, cilj je ovog diplomskog rada istražiti primjenjivost viših alkohola kao ekstraktivnog otapala u proizvodnji bioetanola i predložiti adekvatan tehnološki proces. Pri tome će se istražiti oni alkoholi koji se mogu relativno lako proizvesti iz obnovljivih sirovina organsko/biotehnoškim metodama (oleil alkohol, oktan-1-ol, nonan-1-ol) ili se mogu dobiti iz organskih otpadaka (pentan-1-ol).

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. METODE ZA IZDVAJANJE ETANOLA**

Etanol proizveden alkoholnom fermentacijom uz pomoć mikroorganizama sadržava mnoge nusprodukte koje je potrebno izdvojiti kako bi se dobio čisti etanol. Postoje uglavnom dvije vrste obnovljivih izvora iz kojih nastaju nusprodukti, a to su škrob i lignin. Nusprodukti dobiveni iz škroba uključuju estere, organske kiseline i više alkohole, a nusprodukti dobiveni iz lignina uključuju cikličke i heterocikličke spojeve (Onuki i sur., 2008). Nusprodukti iz fermentacije se uklanjaju destilacijom, međutim neki nusprodukti zaostaju u etanolu. Ako se etanol koristi za piće i farmaceutsku primjenu, nije potrebna visoka konačna koncentracija etanola. U tom slučaju daljnja destilacija je gubitak energije i novca (Onuki i sur., 2008). Destilacija fermentiranih komina i dobivanje etanola tom tehnikom je energetski i financijski zahtjevan proces. Zbog toga su pokrenuta mnoga istraživanja kako bi se pronašla nova ekološki, energetski i financijski učinkovitija tehnika izdvajanja etanola koja bi mogla zamijeniti destilaciju (Onuki i sur., 2008).

#### **2.1.1. Destilacija**

Najpoznatija i najčešće korištena industrijska metoda za izdvajanje etanola je destilacija. Razdvajanje se odvija na temelju razlike u hlapivosti pojedinih komponenata smjese (Onuki i sur., 2008) u kojoj dominiraju voda i etanol. Osnovni princip je da se grijanjem smjese, komponente s niskim vrelištem koncentriraju u parnoj fazi. Kondenzacijom ove pare se u tekućoj fazi dobiva veća koncentracija manje hlapivih spojeva. Destilacija je jedna od najučinkovitijih metoda razdvajanja. Međutim, ima nekoliko nedostataka. Jedan od njih je relativno teško razdvajanje grupe lako hlapivih spojeva. U proizvodnji etanola, destilacijska kolona je napravljena za učinkovito razdvajanje etanola i vode. Voda se dobiva na dnu, a etanol na vrhu kolone. Očekuje se da će se nečistoće sa sličnim vrelištem etanolu naći u izdvojenom etanolu čak i nakon destilacije (Onuki i sur., 2008). Drugi nedostatak je nastajanje azeotropnih smjesa, odnosno nemogućnost dobivanja proizvoda određene čistoće (koncentracije) bez primjene dodatnih koraka izdvajanja kao što su adsorpcija na molekularnim sitima (Vane,

2008) ili uvođenje treće komponente. U industrijskoj praksi su u uporabi višekolonski sustavi za destilaciju u kombinaciji s molekularnim sitima (zeolitima).

### 2.1.2. Adsorpcija

Adsorpcija je separacijska tehnika koja koristi veliku unutarnju aktivnu površinu adsorbensa. Spojevi se jednostavno adsorbiraju na adsorbens ovisno o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. Općenito vrijedi pravilo da se veće čestice više adsorbiraju zbog njihove niske difuzivnosti. Spojevi slične polarnosti površini adsorbensa se također bolje adsorbiraju (Onuki i sur., 2008).

Tehnika adsorpcije se u pročišćavanju etanola primjenjuje u dvije različite svrhe:

a) adsorpcija vode iz azeotropne parne smjese na zeolitskim molekularnim sitima (Huang i sur., 2008) u svrhu postizanja koncentracije etanola veće od 96% (vol/vol),

b) adsorpcija nisko-molekularnih spojeva hlapljivijih od etanola na aktivnom ugljenu (Onuki i sur., 2008) u svrhu dobivanja produkta visoke čistoće.

### 2.1.3. Ozonizacija

Ozon je molekula koja se sastoji od tri kisikova atoma. Ozon može razgraditi (oksidirati) različite vrste spojeva jer ima snažan oksidacijski potencijal. Potpuna razgradnja spojeva rezultira nastajanjem CO<sub>2</sub>, a djelomična oksidacija promjenama u fizikalnim i kemijskim svojstvima spoja, kao što su povećanje hlapivosti, biorazgradivosti i smanjenje toksičnosti (Onuki i sur., 2008). Neki spojevi ne mogu biti oksidirani ozonom i oni zaostaju nakon ozonizacije. Dakle, ozonacijom mogu nastati novi spojevi koji moraju biti olakšano uklonjeni nakon ozonizacije drugim metodama (Onuki i sur., 2008).

### 2.1.4. Stripiranje plinom

Stripiranje plinom je metoda razdvajanja koja se temelji na različitoj hlapivosti spojeva. Efikasnost separacije je dana Henryjevom konstantom (Onuki i sur., 2008). Spojevi sa niskim vrelištem (nižim od etanola), kao što je npr. acetaldehid (koji je glavna nečistoća u fermentacijskom etanolu), se mogu lakše izdvojiti stripiranjem nego drugim metodama (Onuki i sur., 2008).

#### 2.1.5. Pervaporacija

Pervaporacija je metoda razdvajanja tekućih smjesa hlapivih komponenti djelomičnim isparavanjem kroz poroznu ili neporoznu membranu. Izraz je nastao iz činjenice da se tu odvijaju dva procesa: permeacija (prolazak) kroz membranu i isparavanje. Razdvajanje je bazirano na selektivnosti membrane za permeaciju i na hlapivosti komponenti u permeatu. Efikasnost separacije pervaporacijom je uglavnom određena svojstvima membrane i procesnim uvjetima. Fizikalno-kemijska svojstva komponenata koje se odvajaju i onih u smjesi su od manje važnosti nego što je to kod destilacije. To omogućava razdvajanje azeotropnih smjesa. U pervaporaciji, smjesa koja se mora razdvojiti, se ne mora zagrijati do vrenja te je stoga moguće koristiti malu količinu topline. Za razliku od destilacije kod koje je potrebno višestruko isparavanje cijele smjese, pervaporacija troši energiju samo za isparavanje jednog dijela - permeata. Pervaporacija obično ne zahtijeva nikakve dodatne reagense. Azeotropna i ekstraktivna destilacija, ekstrakcija i druge metode koje koriste dodatne kemikalije (sredstva za odvajanje i ekstrakciju) zahtijevaju naknadno odvajanje tih kemikalija, što otežava tehnologiju separacije (Frolkova i Raeva, 2009). No glavna zamjerka pervaporaciji jest relativno spor proces.

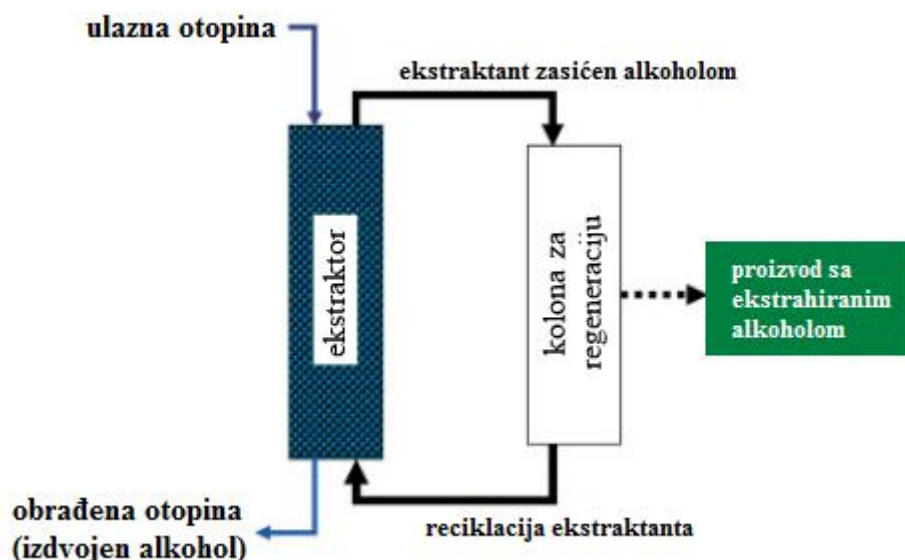
#### 2.1.6. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija kojom se izdvaja jedna (ili više) sastavnica ili komponenata iz krute smjese ili tekućih otopina pomoću otapala. Ekstrakcija otapalima je alternativa destilaciji za izdvajanje etanola iz vodenih otopina kao što su fermentirane podloge, a predmet je mnogih istraživanja dijelom zbog potencijala da troši manje energije nego destilacija (Offeman i sur., 2010), a i zbog sve veće potražnje za proizvodima osjetljivim na promjene temperature, zahtjevima za visokom čistoćom proizvoda, učinkovitije opreme nove generacije i dostupnosti otapala s većom selektivnošću (Seader i Henley, 2006).

## **2.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE**

U ekstrakciji tekuće-tekuće, fermentacijska podloga se stavlja u kontakt s ekstraktantom, pa dolazi do prijenosa mase (ključni spojevi prelaze iz podloge u ekstraktant) kao što je prikazano na slici 2.1. Kontakt može biti izravan (uređaj za miješanje, centrifugalni ekstraktor

ili npr. kolonski ekstraktor) i neizravan, korištenjem porozne permeabilne membrane za odvajanje dviju tekućina, tzv. perstrakcija. Kako bi se ekstraktant ponovno upotrijebio, ekstrahirani spojevi se moraju ukloniti nekom drugom metodom (npr. u koloni za regeneraciju) (Vane, 2008).



**Slika 2.1.** Shematski dijagram procesa ekstrakcije tekuće-tekuće (Vane, 2008).

U izravnoj ekstrakciji tekuće-tekuće, tekuća ishodišna otopina koja se sastoji od dvije ili više komponenata koje treba razdvojiti, se dovodi u kontakt s drugom tekućom fazom – otapalom (ekstraktantom), koje se ne miješa ili se djelomično miješa s jednom ili s više komponenata ishodišne tekuće faze (Seader i Henley, 2006). Otapalo koje se sastoji od jedne kemikalije ili mješavine kemikalija, djelomično otapa pojedine komponente tekuće faze čime se postiže barem djelomično odvajanje ključne komponente od ishodišne tekuće faze (Seader i Henley, 2006). Najjednostavnija tekuće-tekuće ekstrakcija uključuje samo ternarni sustav. Ishodišna otopina se sastoji od dvije komponente koje se miješaju, dok je ekstraktant čisti spoj. Tijekom procesa ekstrakcije dolazi do prijenosa mase ključne komponente, koja se želi ekstrahirati, iz ishodišne smjese u otapalo, (Seader i Henley, 2006) čime se ne dobiva čista ključna sastavnica, nego se ona raspodjeli u dvije nove smjese, ekstrakt i rafinat. Ekstrakt je otopina obogaćena sastavnicom koju se odvaja, a sastavljena je još od otapala (ekstraktanta) i od manje količine otapala iz ishodišne smjese. Nakon što se izdvajana tvar potpuno ekstrahira, potrebno je odvojiti izdvajanu tvar od otapala destilacijom, adsorpcijom, ponovnom

ekstrakcijom ili nekom drugom metodom. Rafinat je otopina koja ostaje nakon djelovanja ekstraktanta na ishodišnu smjesu. Osim ključne sastavnice i tvari iz ishodišne smjese, sadrži još i manju količinu ekstraktanta (Seader i Henley, 2006).

Postoje različiti načini za upravljanje sustavom fermentacije i ekstrakcije, a upotrijebljena metoda je glavni kriterij za odabir otapala. Ako je krajnji produkt fermentacije inhibirajući (u ovom slučaju etanol), produktivnost se može značajno poboljšati kontinuiranim uklanjanjem produkta ekstrakcijom (Minier i Goma, 1982; Daugulis i sur., 1994; Qureshi i sur., 1992). U ovom procesu otapalo je u kontaktu s fermentiranom podlogom ili dijelom podloge koja ne sadržava stanice, i nakon odvajanja od organskog otapala, vodena faza se vraća u fermentor. Neki važni kriteriji za izbor otapala su (Daugulis, 1988): dobra efikasnost ekstrakcije, slaba topivost otapala ekstraktanta u vodenoj fazi, mala toksičnost na proizvodni mikroorganizam i na osoblje, mogućnost učinkovitog izdvajanja produkta iz otapala te regeneracija ekstraktanta, brzo razdvajanje faza, kemijska stabilnost, vrlo mala sklonost stvaranja emulzija ili pjene. Također, ekstraktant ne bi trebao biti pogodan za rast kontaminanata ni radnog mikroorganizma u fermentacijskom sustavu jer bi to dovelo do gubitka otapala (Offeman i sur., 2010).

Drugi način je šaržni proces ekstrakcije (izvan fermentora) gdje se rafinat ne vraća direktno u fermentor. U ovom slučaju je potreba za netoksičnim otapalom prema radnom mikroorganizmu smanjena ili eliminirana, a treba voditi računa o eventualnoj ponovnoj upotrebi vode i obradi u samom postrojenju (Offeman i sur., 2010).

Funkcionalne skupine sadržane u otapalu su primarna odrednica učinkovitosti ekstrakcije (Offeman i sur., 2010). Nekoliko je znanstvenika poredalo otapala po klasama na temelju eksperimentalne usporedbe učinkovitosti: karboksilne kiseline > alkoholi > esteri > amini > ketoni > eteri > ugljikovodici (Roddy, 1981; Munson i King, 1984; Cabral, 1991). Alkoholi, esteri i ketoni su zanimljivi zbog njihove niske reaktivnosti u odnosu na karboksilne kiseline i amine i njihov općenito veći koeficijent raspodjele u odnosu na etere i ugljikovodike (Offeman i sur., 2006).

### 2.2.1. Otapala za ekstrakciju

Otapala korištena u tekuće-tekuće ekstrakciji etanola iz razrijeđenih vodenih fermentacijskih otopina moraju zadovoljiti ne samo standardne zahtjeve, uključujući slabu topivost u vodenoj fazi, kratko vrijeme separacije, kemijsku inertnost i ekološku prihvatljivost,

već i niz specifičnih zahtjeva. Primjerice, ako se vodena faza vraća u fermentor, otapalo za ekstrakciju ne smije biti toksično i hranjivo za mikroorganizme (Offeman i sur., 2008). Otapalo mora imati visok afinitet za otoplenu tvar, od koje bi se trebalo lako odvojiti destilacijom, kristalizacijom ili drugim metodama.

Smatra se da su sljedeći čimbenici važni za izbor odgovarajućeg otapala (Offeman i sur., 2005, Munson i King, 1984, Dadgar i Foutch, 1985):

1. **Selektivnost** alkohola u odnosu na vodu. Viša selektivnost rezultira boljim razdvajanjem etanola od ishodišne otopine.

$$\alpha = \frac{U_{C,E}/U_{A,E}}{U_{C,R}/U_{A,R}} \quad [1]$$

2. **Koeficijent razdjeljenja**  $K_D$  je odnos ravnotežnih koncentracija u otapalu i vodenoj fazi. Poželjne su više vrijednosti koeficijenta razdjeljenja za alkohol jer se time smanjuje količina ekstraktanta potrebna za uklanjanje određene količine alkohola uz istodobno smanjenje kapitalnih i operativnih troškova za ekstrakcijski sustav.

$$K_D = \frac{C_{A1, eq}}{C_{A2, eq}} \quad [2]$$

3. **Međusobna topljivost.** Idealno, ekstraktant i voda ne bi trebali biti međusobno topljivi. Očekuje se određena topljivost u ekstraktantu, a vjerojatna je ako ekstraktant ima visok afinitet prema alkoholima. Topljivost ekstraktanta u vodenoj fazi rezultira gubitkom ekstraktanta iz sustava ekstrakcije i može predstavljati probleme kod izdvajanja, budući da se ekstraktant može vratiti u bioreaktor s recirkulacijskim tokom, poremetiti uzgoj ili dospjeti na obradu otpadnih voda.
4. **Sposobnost razdvajanja faza.** Razdvajanje ekstraktanta i vodene faze se obično zasniva na razlici gustoće između faza, kemijskoj inkompatibilnosti, gravitacijskoj sili ili na centrifugalnoj sili (npr. u tekuće-tekuće kontinuiranoj centrifugi).
5. **Međufazna napetost.** Kada su dvije faze u izravnom kontaktu, poželjno je snažno miješanje, a mora se izbjeći stvaranje stabilnih emulzija.
6. **Viskoznost ekstraktanta.** Niska viskoznost ekstraktanta je općenito poželjna jer poboljšava prijenos mase u ekstrakciji i regeneraciji, te smanjuje energiju potrebnu za kretanje i miješanje ekstraktanta.
7. **Toksičnost, sigurnost i reaktivnost.** Ekstraktant može inhibirati rast mikroorganizama u bioreктору ili može negativno djelovati na druge komponente, kao što su enzimi. Osim toga, mora se uzeti u obzir toksičnost ekstraktanta u otpadnim vodama.

Zapaljivost i reaktivnost s procesnim kemikalijama ekstraktanta i smjese ekstraktanta i alkohola predstavlja problem sigurnosti postrojenja.

8. **Hlapivost.** Poželjne karakteristike hlapivosti ekstraktanta razlikuju se ovisno o načinu regeneracije ekstraktivnog otapala. Ako se etanol izdvaja iz ekstraktanta isparavanjem ili stripiranjem, pri sobnoj ili povišenoj temperaturi, poželjna je niska hlapivost ekstraktanta. Međutim, ako se koristi destilacijski proces u kojem ekstraktivno otapalo ima niže vrelište od produkta (koncentrira se na vrhu destilacijske kolone), određeni stupanj hlapivosti i niska temperatura isparavanja mogu biti korisne.
9. **Cijena.** U idealnom slučaju, ako bi se ekstraktant potpuno regenerirao i ponovo upotrebljavao u ciklusima, potrebna bi bila samo početna količina ekstraktanta. Međutim, zbog gubitka ili mogućih kemijskih reakcija, potrebno je povremeno dodavati (nadomjestiti) određene količine ekstraktanta. U takvom slučaju niska cijena je prednost.

Prema nekim autorima (Frolkova i Raeva, 2009), prikladno je koristiti ekstrakciju za vodene otopine koje sadrže 2-5 % tež/tež etanola. Razrijeđene otopine se ponekad koncentriraju do 10-30 % tež/tež etanola

Biljna ulja i njihovi derivati su istraživani za uporabu kao ekstraktanti u fermentaciji. Za izdvajanje etanola iz fermentacijske podloge, mnogi su istraživali upotrebu oleil alkohola kao ekstraktanta jer zadovoljava mnoge navedene kriterije. Općenito, oleil alkohol je netoksičan za radni mikroorganizam. Međutim, učinkovitost ekstrakcije etanola tim otapalom je neprikladna za komercijalnu primjenu (Offeman i sur., 2006). Predložena je upotreba ugljikovodika veće molarne mase i biljnih ulja koja tvore konjugirani par u otopini s etanolom. U obzir su uzeti heksadekan, ulje sjemenki pamuka i bijelo svijetlo parafinsko ulje. Ekstrakcija je provedena pri povišenoj temperaturi, a etanol je izdvojen iz otapala snižavanjem temperature što rezultira razdvajanjem faza (Mehta i Fraser, 1985). Razmatralo se i korištenje maslinovog, kokosovog ili sojinog ulja kao otapala za ekstrakciju u sličnom postupku, ali je upotrijebljeno samo sojino ulje u eksperimentu u kojem je ekstrakcija etanola, iz otopine koja je sadržavala manje od 30% etanola, bila niska te nije postigla značajne rezultate. Bolji rezultati dobiveni su s otopinom sadržaja iznad 60%, ali su omjeri otapala i otopine bili prilično visoki (Rahman i sur., 1995). Ulja i derivati estera i alkohola s funkcionalnim skupinama koji mogu tvoriti veze s etanolom i vodom su posebno zanimljivi zbog povećanja koeficijenta raspodjele etanola. Ricinusovo ulje se sastoji primarno od (87-89%) ricinoleične kiseline (Aichholz i sur., 1998) koja ima



hidroksilnu skupinu na 12 ugljikovom atomu. Hidroksilna skupina bi trebala povećati kapacitet vezanja etanola pružanjem dodatnih mjesta vezanja vodika, u usporedbi s uljima koja ne sadrže takve skupine. Ovaj učinak bi se također trebao očitovati kod hidroksiliranih derivata estera i kod viših alkohola (Offeman, 2006).

Istraživanjem ekstrakcije otapalima, ustanovljeno je da nekoliko  $\beta$  – razgranatih alkohola s 14-20 ugljikovih atoma pokazuju bolju učinkovitost ekstrakcije za dobivanje etanola iz vodenih otopina u usporedbi s uobičajenim otapalima kao što su oleil alkohol i 1-dodekanol. Ovi  $\beta$  – alkoholi su odabrani za istraživanje na temelju ekstrapolacije rezultata u ranijim radovima s otapalima alifatskih alkohola manje molekulske mase. Ukazano je da bi se mogao ostvariti bolji faktor separacije kad je hidroksilna grupa u sredini lanca i kad postoji grananje. Toksičnost otapala na komercijalni kvasac koji se obično koristi za proizvodnju etanola, je istražena za ove alkohole, te za nekoliko alkohola manje molarne mase. Od istraživanih alkohola, oni s 12 ili manje ugljikovih atoma su bili toksični ili inhibirajući za kvasac; oni s 14 ili više ugljikovih atoma nisu bili toksični te nisu inhibirali rast kvasca (Offeman i sur., 2008).  $\beta$  – razgranati alkoholi se dobivaju Guerbetovom reakcijom ili okso procesom (hidroformilacija alkena do aldehida s naknadnom redukcijom u alkohol). Guerbetova reakcija pretvara primarni alifatski alkohol u  $\beta$  - alkilirani dimer alkohol. Najčešće su korišteni alkoholi iz prirodnih izvora, koji sadrže paran broj ugljikovih atoma. Okso alkoholi su bili izvedeni hidroformilacijom linearnih olefina. Alkoholi koji imaju 14 - 20 ugljikovih atoma, su slabo topivi u vodenoj fazi. Njihova razgranatost je razlog zbog čega su pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, dok su nerazgranati ravnolančani izomeri (n-alkoholi) iste molekularne mase na istoj temperaturi u čvrstom stanju. Ova otapala imaju visoke temperature vrelišta ( $>290$  °C) pa izdvajanje ekstrahiranog etanola može biti izvedeno jednostavnim procesom isparavanja (pervaporacijom) ili u nekoliko stupnjeva destilacije (Offeman i sur., 2008). Što se tiče toksičnosti alkohola na kvasac, alkoholi male molarne mase (C2-C10) su toksični ili inhibirajući (za rast kvasca i/ili proizvodnju etanola), dok alkoholi veće molarne mase nisu toksični ili inhibirajući (Minier i Goma, 1982). Alkoholi srednjih molarnih masa (10 – 12 ugljikovih atoma) pokazuju različite toksičnosti i inhibicije, a varijacije su vjerojatno posljedica različitih metoda istraživanja, analize, vrsta kvasaca i primijenjenih raspona koncentracije otapala. Pokazano je da se sprječavanjem izlaganja kvasca direktnom kontaktu s otapalom smanjuje toksičnost jer je kvasac izložen otapalu samo u vodenoj fazi. To je provedeno razdvajanjem kvasca od otapala pomoću porozne membrane (Cho i Shuler, 1986), ili inkapsuliranjem kvasca u kuglice alginata s biljnim uljem (Honda i sur., 1986). U drugom

istraživanju, neka otapala koja su potpuno inhibirala rast kvasca u zasićenoj vodenoj fazi su djelomično ili nisu inhibirala rast kod primjene koncentracije od 10% zasićenja (Murphy i sur., 1982).

Osim alkohola istraživane su pentanska, heksanska, oktanska, nonanska i oleinska kiselina kao ekstraktanti pri 25 °C iz otopina etanol/voda u rasponu koncentracija od 0,01 - 0,08 g/mL etanola. Otkriveno je da se koeficijent raspodjele etanola, kao i koeficijent raspodjele vode, smanjivao s porastom molekularne mase otapala (Boudreau i Hill, 2006). Ove kiseline su komercijalno dostupne, a dobivene su oksidacijom odgovarajućih alkohola. Imaju nekoliko poželjnih karakteristika, kao što su niska točka tališta, visoko vrelište, te vrlo niska topivost u vodi. Koriste se u kozmetici, farmaceutici, osobnoj njezi i obradi metala te kao kemijski intermedijeri za esterifikaciju, alkoksilaciju i sl. (Offeman i sur., 2010).

Istraživanja su pokazala da su kvasci u kontaktu s kiselinama manje molekularne mase proizveli znatno manje etanola, te potrošili manje glukoze, imali manju vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolnim tikvicama gdje su rasli bez otapala. Oni u kontaktu s kiselinama veće molarne mase, imali su proizvodnju etanola, potrošnju glukoze i vijabilnost stanica ekvivalentnu kontrolnim pokusima (bez prisustva otapala; Offeman i sur., 2010).

U provedenim eksperimentima, kiseline su pokazale niži koeficijent raspodjele etanola i veći faktor separacije u odnosu na odgovarajuće alkohole. Faktor separacije se, kod kiselina, povećava kako je karboksilna skupina bliže sredini molekule te povećanjem grana alkilnih lanaca. Karboksilne kiseline koje sadrže 12 ili manje ugljikovih atoma bile su toksične ili su inhibirale rast kvasca, dok su kiseline s 16 i više ugljikovih atoma bile netoksične i nisu inhibirale rast kvasca (Offeman i sur., 2010).

Kako je većina efikasnih otapala za ekstrakciju toksična, jedno od rješenja je korištenje prirodnih organskih otapala, kao što su masne kiseline. Masne kiseline su važni metabolički spojevi u svim živim bićima (Boudreau i Hill, 2006). Otkriveno je da oleinska kiselina, ne samo da nije toksična za radni mikroorganizam, već i pojačava proces fermentacije (Stang i sur., 2001).

Uspješnost ekstrakcije etanola različitim otapalima pri jednakim radnim uvjetima se može prikladno predstaviti pomoću dva parametra – koeficijenta raspodjele i faktora separacije. Koeficijent raspodjele etanola pokazuje kapacitet otapala za etanol, dok faktor separacije predstavlja selektivnost otapala obzirom na etanol i vodu. Ravnotežni koeficijent raspodjele etanola je omjer masenog udjela etanola u organskoj fazi i masenog udjela etanola u vodenoj fazi:

$$K_{DE} = \frac{w(EtOH)_{org}}{w(EtOH)_{aq}} \quad [3]$$

Ravnotežni koeficijent raspodjele za vodu definiran je na sličan način:

$$K_{DW} = \frac{w(H_2O)_{org}}{w(H_2O)_{aq}} \quad [4]$$

Faktor separacije je omjer ravnotežnih koeficijenata raspodjele etanola i vode (Offeman i sur., 2008):

$$\alpha = \frac{K_{DE}}{K_{DW}} \quad [5]$$

Ravnotežni koeficijent raspodjele i faktor separacije za pojedina otapala dani su u tablici 2.1 (Offeman i sur., 2008).

**Tablica 2.1.** Koeficijenti raspodjele etanola i faktor separacije (izvadak iz Offeman i sur., 2008, Offeman i sur., 2005).

Otapalo	$K_{DE}$	$\alpha$
pentan-3-ol (čistoća 99,8%)	1,29	12,3
oktan-1-ol (čistoća 99,93%)	0,716	12,0
nonan-1-ol (čistoća 99,5%)	0,63	12,6
oleil alkohol (čistoća 93%)	0,306	16,1

Vrijednosti koeficijenta raspodjele za alkohole s 14 - 20 ugljikovih atoma su manje od alkohola s manjom molekulskom masom. Koeficijent separacije se smanjuje relativno malo za alkohole s 14 -20 ugljikovih atoma, ali se faktor separacije znatno povećava kako je hidroksilna grupa bliže sredini lanca, te grananjem alkilnih lanaca.

### 2.2.2. Oprema

Obzirom na raznolikost primjene postoji puno različitih uređaja za tekuće-tekuće ekstrakciju. Ponekad se koristi oprema (kolone) slična onoj koja se koristi za adsorpciju, stripiranje ili destilaciju, ali takvi uređaju su obično neučinkoviti, osim ako su viskoznosti primijenjenih tekućine niske, a razlike u gustoći faza izrazito visoke (pa je gravitacijsko razdjeljivanje faza uspješno). Postojeći problem moguće je riješiti korištenjem centrifugalnih i mehaničkih uređaja za miješanje i razdvajanje faza (Seader i Henley, 2006). Ekstrakcija se

može provoditi kao šaržni ili kontinuirani proces, a oba se mogu provoditi u jednom ili u više stupnjeva. U šaržnoj ekstrakciji, ekstraktor se napuni otapalom, izmiješaju se faze djelovanjem mehaničke sile te se nakon gravitacijskog odvajanja, ekstrakt isprazni. Kontinuirane ekstrakcije se mogu podijeliti na protusmjerne i istosmjerne. Ekstraktori koji se koriste mogu biti kolonski s punilima ili miješalima, te centrifugalni.

### **2.3. FERMENTACIJA NA LIGNOCELULOZNIM SIROVINAMA**

Proizvodnja etanola na šećernim i škrobnim sirovinama uzrokuje rast cijena prehrambenih proizvoda. Uporaba lignoceluloznih sirovina ne konkurira proizvodnji hrane i nema direktan utjecaj na njenu cijenu. Potencijalni izvor za jeftinu proizvodnju etanola je korištenje lignoceluloznog materijala kao što su ostaci usjeva, trave, piljevina, drvni ostaci i kruti životinjski otpad (Sun i Cheng, 2002). Pretvorba lignoceluloznih sirovina do etanola uključuje dva procesa, hidroliza celuloze i hemiceluloze u lignoceluloznim materijalima do fermentabilnih šećera i fermentaciju šećera (pentoza i heksoza) do etanola. Hidroliza može biti djelomično ili potpuno izvedena (katalizirana) celulolitičkim enzimima, a fermentaciju provode kvasci ili bakterije (Sun i Cheng, 2002). Glavni faktori koji utječu na hidrolizu celuloze uključuju poroznost (dostupna površina) otpadnih materijala, kristaličnost celuloznih vlakana, te sadržaj lignina i hemiceluloze (McMillan, 1994). Prisutnost lignina i hemiceluloze otežava pristup celulolitičkih enzima do celuloze čime se smanjuje učinkovitost hidrolize (Sun i Cheng, 2002). Uklanjanje lignina i hemiceluloze, smanjenje kristaličnosti celuloze i povećanje poroznosti u procesima predobrade može značajno poboljšati hidrolizu (McMillan, 1994). Za predobradu lignoceluloznih sirovina koriste se fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke metode (Sun i Cheng, 2002).

### **2.4. MIKROORGANIZMI**

Da bi se proizveo etanol na lignoceluloznim sirovinama, takve sirovine se moraju najprije podvrgnuti predobradi s ciljem dobivanja jednostavnih sastojaka koje mikroorganizmi mogu prevesti u etanol. Nakon predobrade (koja je obično kombinacija fizikalnih, termičkih i kemijskih metoda), hidrolizat sadržava fermentabilne šećere i širok raspon spojeva koji imaju inhibicijske učinke na mikroorganizme korištene za fermentaciju. Sastav tih spojeva ovisi o

vrsti upotrijebljenog lignoceluloznog materijala te o postupku predobrade (Olsson, i Hahn-Hägerdal, 1996). Od fermentabilnih šećera, hidrolizati sadržavaju heksoze i pentoze. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* lako prevodi heksoze u etanol, dok se pentoze slabo ili uopće ne fermentiraju. Nekoliko je ekonomskih procjena pokazalo kako je uspješna fermentacija pentoza važna za ukupnu ekonomiju proizvodnje etanola na lignoceluloznim sirovinama (Lynd, 1990; Wright, 1988; Ladisch i Svarczkopf, 1991; Nguyen i Saddler, 1991). Kako bi se ostvarila ekonomična proizvodnja etanola na lignoceluloznim materijalima bio je potreban razvoj funkcionalnog organizma i razvoj procesnih tehnika (npr. strategije integracije fermentacijskih koraka i izolacije produkta u sveukupni proces; Olsson, i Hahn-Hägerdal, 1996).

Pentozne iz hemiceluloze se sastoje uglavnom od ksiloze, ali ovisno o podrijetlu sirovine količina arabinoze može biti značajna. Mikroorganizmi koji učinkovito fermentiraju ksiloze su pojedine bakterije, kvasci i plijesni (prirodni i rekombinantni). Od bakterija koje se pojavljuju u prirodi, najveći prinos daje *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Neke rijetke bakterije mogu fermentirati i celulozu i druge polimere, a ne samo monosaharide (Wiegel i Ljungdahl, 1986). *Zymomonas mobilis* je izuzetna bakterija u smislu proizvodnje etanola s visokim prinosima i produktivnošću, ali izvori ugljika koje može koristiti ta bakterija su ograničeni na glukozu, fruktozu i saharozu (Swings i De Ley, 1977; Olsson i Hahn-Hägerdal, 1993). Korišteno je genetičko inženjerstvo kako bi se povećao prinos etanola kod bakterija, što je rezultiralo rekombinantnim bakterijama koje daju visoke prinose te imaju visoku produktivnost (Olsson, i Hahn-Hägerdal, 1996).

*Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* i *Pichia stipitis* su najtemeljitiše istraženi i najefikasniji prirodno prisutni kvasci koji fermentiraju ksilozu. I pojedine vrste iz drugih rodova kvasaca kao što su *Clavispora* sp., *Kluyveromyces*, *Pichia segobiensis* daju solidne prinose etanola (Olsson, i Hahn-Hägerdal, 1996).

Za proizvodnju etanola na heksozama, *Saccharomyces cerevisiae* je najviše korišten procesni organizam koji daje visoke prinose i produktivnost uz izuzetnu toleranciju prema etanolu. Neobična svojstva ovog kvasca rezultat su prilagodbe učinkovitoj proizvodnji etanola iz heksoza tijekom tisuća godina. Međutim, *Saccharomyces cerevisiae* ne može koristiti ksilozu za proizvodnju etanola dok izomer ksiloze (ksiluloza) može fermentirati. Stoga se genetičkim inženjerstvom nastoji razviti sojeve *Saccharomyces cerevisiae* koji mogu fermentirati ksilozu. Na žalost, do sada su dobiveni samo niski prinosi etanola iz ksiloze (Kötter i Ciriacy, 1993; Tantirungkij i sur., 1993; Meinander i sur., 1994).

**Tablica 2.2.** Fermentacija lignoceluloznih hidrolizata (izvadak iz Olsson i Hanh-Hägerdal, 1996).

Mikroorganizam	Sirovina	Predtretman	Šećeri (g L <sup>-1</sup> )	Etanol (g L <sup>-1</sup> )	Prinos (g g <sup>-1</sup> )	Produktivnost (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<b>Mikroorganizmi koji fermentiraju pentoze</b>						
<b>Bakterije</b>						
<i>Clostridium</i>						
<i>thermosacchrolyticum</i> ATCC 31925	Piljevina	Kiselina	Ksiloz 7,5	1,2	0,16	0,05
<i>Escherichia coli</i> B (pLOI 297)	Jasika	Sumporni dioksid	Ksiloz 31,0	14,9	0,48	0,26
<b>Kvasci</b>						
<i>Candida shehatae</i> ATCC 22984						
	Meko drvo	SSL	Arabinoz 2,9 Glukoza 4,7 Galaktoz 6,5 Manoz 14 Ksiloz 7,0 Arabinoz 0,9 Glukoza 6,2	13,0	0,37	0,36
<i>P. stipitis</i> CBS 5776 (R)	Jasika	Kiselina	Galaktoz 0,8 Manoz 1,2 Ksiloz 15,0	5,0	0,21	0,14
<b>Plijesni</b>						
<i>Mucor</i> sp. 105	Bagasa šećerne trske	Kiselina	Arabinoz 8,6 Glukoza 14,5 Ksiloz 44,6	19,5	0,29	0,16
<b>Mikroorganizmi koji fermentiraju heksoze</b>						
<i>S. cerevisiae</i>	Jasika	Sumporni dioksid + Kiselina	Glukoza 49,9	23,8	0,48	1,50
<i>Z. mobilis</i> NRRL 14023	Jasika	Sumporni dioksid + Kiselina	Glukoza 49,9	24,2	0,48	3,50

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu kao radni mikroorganizam korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* izoliran iz sladorane Županja.

##### 3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

**Tablica 3.1.** Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
acetone	p.a.	Kemika, Hrvatska
agar	tehnička	Biolife, Italija
apsolutni etanol	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
D-(+)-glukoza	za mikrobiologiju	Merck, Njemačka
diamonijev hidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
diamonijev sulfat	p.a.	Zorka Šabac, Srbija
kvašćev ekstrakt	za mikrobiologiju	Merck, Njemačka
nonan-1-ol	≥98%	Sigma Aldrich, Njemačka
(Z)-octadec-9-en-1-ol (oleil alkohol)	60%	Acros, Njemačka
oktan-1-ol	99%	Acros, Njemačka
pentan-1-ol	99,97%	Fisher Chemical, UK

##### 3.1.2.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj kvasca

Kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čuvana je i održavana na podlozi (kosim agarima) sastava: 25 g/L glukoze, 1,5 g/L kvašćevog ekstrakta, 1 g/L diamonijevog fosfata, 1 g/L diamonijevog sulfata, 15 g/L agara, demineralizirana voda ( $< 1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) do 1000 mL.

Ova hranjiva podloga korištena je i za pripravu inokuluma za uzgoj kvasca u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Za razliku od čvrste podloge, tekuća podloga nije sadržavala agar. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta.

Sastav hranjive podloge za testiranje toksičnosti otapala (uzgoj kvasca u tikvicama s odbijačima): 1 g/L glukoze, 1,5 g/L kvašćevog ekstrakta, 1 g/L diamonijevog fosfata i 1 g/L diamonijevog sulfata. Podloga je pripremljena u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL s odbijačima i sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. Kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izrasla na kosoj čvrstoj hranjivoj podlozi suspendirana je u 5 mL sterilne demineralizirane vode te je njome inokulirano 150 mL tekuće hranjive podloge u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL. Nakon dodatka inokuluma dodano je 3%, odnosno 10% vol/vol otapala.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1. Plinski kromatograf, GC

Koncentracija etanola i viših alkohola određena je u tekućoj fazi uzoraka izuzetih tijekom eksperimenata kako bi se izradile binodalne krivulje s ravnotežnim linijama, konstruirali baždarni dijagrami, te tijekom uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i procesa ekstrakcije. Nakon ekstrakcije etanola iz vodene u organsku fazu, određena je koncentracija pomoću plinsko-kromatografskog sustava Shimadzu GC 2010*Plus* AF (Shimadzu, Kyoto, Japan) (Slika 3.1.). Sustav se sastoji od: automatskog uzorkivača (150 mjesta; AOC - 20s), injektora (AOC - 20i), peći, ZB-WAX plus (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m df; Zebron, SAD), plameno-ionizacijskog detektora (eng. Flame-Ionization Detector, FID) i programa za prikupljanje i obradu podataka GC Solutions verzija 2.32.

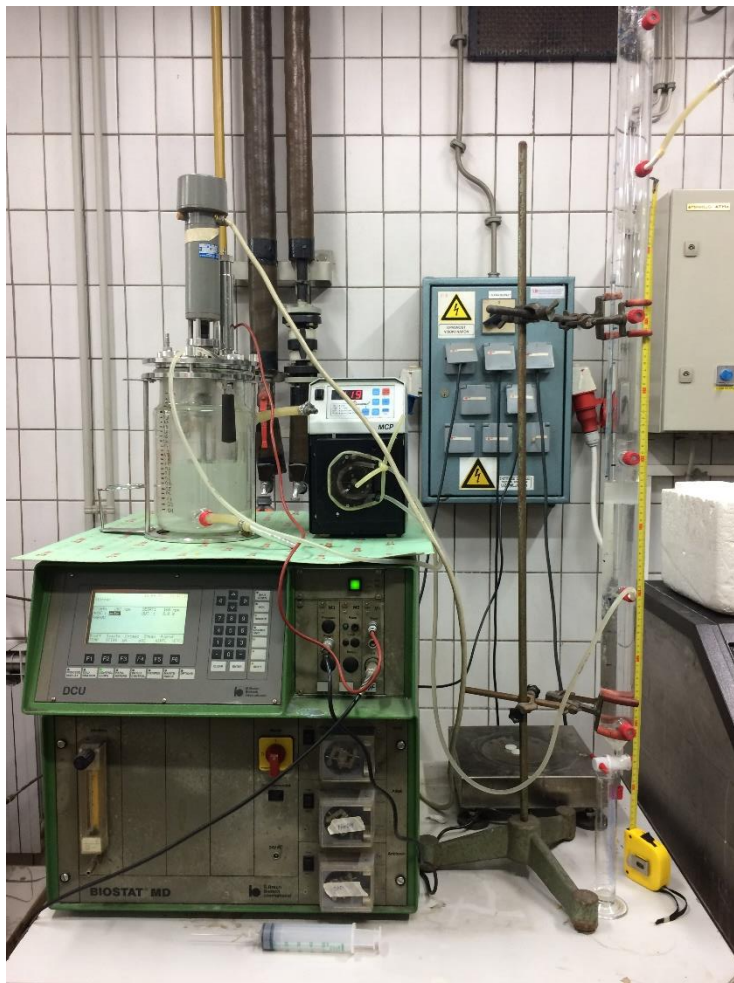




**Slika 3.1.** Plinski kromatograf Shimadzu GC-2010*Plus* AF (Shimadzu, Kyoto, Japan). 1. automatski uzorkivač; 2. automatski injektor; 3. peć; 4. kapilarna kolona; 5. plameno-ionizacijski detektor; 6. računalo s programom za prikupljanje i obradu podataka.

### *3.1.3.2. Oprema za istraživanje kontinuirane ekstrakcije*

Za ekstrakciju etanola iz vodene otopine korištena je posuda s miješalom, korisnog volumena 1,5 L, peristaltička pumpa Ismatec MCP V5.17 (Zürich, Švicarska), te staklena kolona za razdvajanje faza ( $H = 1,25$  m,  $r = 0,025$  m,  $V = 2$  L). Uređaj za testiranje ekstrakcije prikazan je na slici 3.2.



**Slika 3.2.** Uređaj za testiranje ekstrakcije etanola višim alkoholima.

### *3.1.3.3. Ostala oprema*

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan)
- autoklav Sutjeska
- centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fisher, Waltham, SAD)
- mikroskop CH20BIMF200 (Olympus optical Co, LTD., Japan)
- staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka)
- sušionik Instrumetarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska)
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- Thomaova komorica
- tresilica Certomat RM B. Braun Biotech Intternation (Hessen, Njemačka)
- tresilica vorteks LLG-uniTEXER 1, EU-plug (Meckenheim, Njemačka)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Analitičke metode

Tijekom uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u Erlenmeyerovim tikvicama s odbijačima praćena je optička gustoća ( $OD_{600}$ ) izuzetih uzoraka (u svrhu određivanja koncentracije biomase). Nakon izdvajanja biomase centrifugiranjem, supernatanti su korišteni za analizu sadržaja etanola i ekstraktanata metodom plinske kromatografije (GC).

#### 3.2.1.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge

Određeni volumen svakog uzorka ( $V \approx 4$  mL) prenesen je u kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) i pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija) određena je optička gustoća pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 600 nm ( $A_{600}$ ).

#### 3.2.1.2. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom (GC)

Baždarni pravci za određivanje etanola u vodenoj otopini i u ekstraktima (koji sadrže pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol ili oleil alkohol kao organsko otapalo) načinjeni su plinskom kromatografijom smjesa koje su sadržavale 1200  $\mu$ L acetona, 150  $\mu$ L heksanola i 150  $\mu$ L uzorka. Uzorak se sastojao od etanola (0,5 %; 1 %; 3 %; 5 %; 8% vol/vol) i otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol).

U postupku određivanja sastava ekstrakta i rafinata (u svrhu konstrukcije binodalnih krivulja) izuzeti je dio organske i vodene faze iz svake epruvete. Uzorci su analizirani plinskom kromatografijom. U kivetu je otpipetirano 150  $\mu$ L ekstrakta, odnosno rafinata, 150  $\mu$ L heksanola i 1200  $\mu$ L acetona.

Uzorci koji su sadržavali kulturu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prethodno su centrifugirani (4500 g, 10 min, 4 °C, Thermo Scientific SL 8R, Thermo Fisher, SAD) čime je izdvojena biomasa. Iz dobivenih supernatanata izuziman je uzorak koji je analiziran plinskim kromatografom. U kivetu je otpipetirano 150  $\mu$ L supernatanta, 150  $\mu$ L heksanola i 1200  $\mu$ L acetona.

Nakon pripreme uzorka špicom za automatski injektor ( $V = 10$   $\mu$ L; SGE Analytical Science Pty Ltd., Ringwood, Australija) uzeto je 1  $\mu$ L priređenog uzorka i injektorom uvedeno

u struju plina nosioca - helija. Temperatura sustava za evaporaciju bila je 210 °C, tako su sve komponente prevedene u plinoviti oblik i uvedene u kolonu. Za održavanje plamena u plameno-ionizacijskom detektoru korišteni su sintetski zrak i vodik. Početna temperatura kolone za kromatografiju održavana je pri 90 °C kroz 2 min, zatim je povećavana brzinom od 20 °C min<sup>-1</sup> do 240 °C te je na ovoj temperaturi održavana kroz 4 min. Koncentracija etanola i ekstraktanta je dobivena određivanjem površine ispod pika primjenom softvera GC Solutions verzija 2.32 i integratora ugrađenog u uređaj.

### 3.2.1.3. *Određivanje broja živih stanica indirektnom metodom (CFU)*

Na Petrijeve zdjelice s čvrstom podlogom (sladni agar, točka 3.1.2.1.) nacijepljeno je 0,1 mL određenog razrjeđenja (10<sup>-3</sup> i 10<sup>-4</sup>). Nacijepljena suspenzija jednoliko je raspoređena po podlozi štapićem Drigalsky, ploče su termostatisane pri 30 °C kroz 72 sata. Broj živih stanica određen je brojanjem izraslih kolonija (30 – 300) na pločama.

### 3.2.2. Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola

#### 3.2.2.1. *Preliminarno istraživanje ponašanja dvokomponentnih (etanola + voda); (etanola + ekstraktant); (voda + ekstraktant) i trokomponentnih smjesa (etanola + voda + ekstraktant)*

U graduirane epruvete su otpipetirani određeni volumeni etanola i otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol) u različitim omjerima (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1).

U drugu seriju epruveta su otpipetirani voda i pojedina otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol) u omjeru 1:1. Nakon intenzivnog miješanja promatrano je razdvajanje faza.

Homogenost trokomponentne smjese otapalo + etanol + voda ispitivana je u graduiranim epruvetama. U epruvete su otpipetirani voda i otapalo u omjerima 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5 i 98:2. U epruvete je dodavana određena količina etanola kako bi se postigla homogena smjesa. Izračunati je maseni udio pojedinih komponenata u otopini te je u programu SigmaPlot v11.0 nacrtan binodalni trokomponentni dijagram.

### 3.2.2.2. Formiranje ravnotežnih linija binodalnih trokomponentnih dijagrama

Odabrani su različiti omjeri nonan-1-ola, vode i etanola (40:40:20, 30:40:30, 50:30:20, 55:30:15, 70:20:10, 27:36:37, 40:53:7, 47:38:15, 40:40:20, 50:20:30) otpipetirani u epruvete, dobro homogenizirani te je otopina ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi došlo do razdvajanja komponenata na ekstrakt i rafinat. Iz obje faze su uzeti uzorci i analizirani plinskom kromatografijom na sadržaj etanola i organskog otapala. Sadržaj vode kao treće komponente izračunat je iz jednadžbe:

$$V(\text{vodene faze}) = V(\text{voda}) + V(\text{etanol}) + V(\text{ekstraktant}) \quad [6]$$

$$V(\text{organske faze}) = V(\text{voda}) + V(\text{etanol}) + V(\text{ekstraktant}) \quad [7]$$

Isti postupak je ponovljen s ostalim otapalima, ali su odabrani drugačiji omjeri (pentan-1-ol:voda:etanol 40:55:5, 40:50:10, 30:50:20; oktan-1-ol:voda:etanol 40:55:5, 40:50:10, 50:35:15, 30:50:20; oleil alkohol:voda:etanol 30:40:30, 40:40:20, 50:30:20, 55:30:15, 70:20:10, 20:40:40, 30:30:40, 40:30:30, 20:30:50).

Rezultati određivanja ravnotežnih koncentracija nanoseni su na trokutni dijagram pri čemu su točke koje razgraničavaju homogeni sustav od nehomogenog međusobno povezane u binodalnu krivulju. Parovi točaka ravnotežnih koncentracija na strani ekstrakta i rafinata povezani su spojnicama.

Koeficijent raspodjele etanola  $K_{DE}$  računa se kao omjer ravnotežne koncentracije etanola u otapalu i vodi prema jednadžbama:

$$K_{DE} = \frac{w(\text{EtOH})_{org}}{w(\text{EtOH})_{aq}} \quad [8]$$

$$K_{DW} = \frac{w(\text{H}_2\text{O})_{org}}{w(\text{H}_2\text{O})_{aq}} \quad [9]$$

gdje je:  $K_{DE}$  – koeficijent raspodjele za etanol,  $w(\text{EtOH})_{org}$  – maseni udio etanola u otapalu,  $w(\text{EtOH})_{aq}$  – maseni udio etanola u vodi,  $K_{DW}$  – koeficijent razdiobe za vodu,  $w(\text{H}_2\text{O})_{org}$  – maseni udio vode u otapalu,  $w(\text{H}_2\text{O})_{aq}$  – maseni udio vode u vodi (Offeman i sur. 2005).

Faktor separacije je omjer ravnotežnih koeficijenata raspodjele, a opisuje stupanj selektivnosti tvari u jednom ekstrakcijskom stupnju:

$$\alpha = \frac{K_{DE}}{K_{DW}} \quad [10]$$

### 3.2.3. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata hranjive podloge (hidrolizat lignoceluloznog kompleksa i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*)

U graduirane epruvete dodano je 30 % vol/vol pojedinog otapala ekstraktanta (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol ili oleil alkohol), demineralizirana voda 70 % vol/vol ( $< 1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) i kvasac u koncentraciji od 10 g/L. Ukupni volumen iznosio je 20 mL. Smjesa je intenzivno miješana te su vizualno praćene promjene u razdvajanju slojeva kroz 4 h. U drugoj seriji pokusa je smjesa osim kvasca, vode i otapala sadržavala i 10 % vol/vol etanola.

U trećoj seriji pokusa smjesa je sadržavala kvasac (10 g/L) i otapalo (30% vol/vol), a umjesto vode je u jednakoj količini dodan hidrolizat lignoceluloznog kompleksa. U četvrtoj seriji pokusa je smjesa osim kvasca, vode i hidrolizata lignoceluloznog kompleksa sadržavala i 10 % vol/vol etanola. Iz obje faze je uzet uzorak koji je stavljen u Thomaovu komoricu pod mikroskop kako bi se utvrdilo ima li kvašćevih stanica.

### 3.2.4. Određivanje toksičnosti otapala na kulturu stanica kvasca

Suspenzija kulture *Saccharomyces cerevisiae* (15 mL) u eksponencijalnoj fazi rasta precijepljena je iz tekuće hranjive podloge u tikvice s odbijačima ( $V_K = 500 \text{ mL}$ ). Dodano je po 3%, odnosno 10% vol/vol otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol), a tikvice su inkubirane kroz 24 sata pri temperaturi od 30 °C.

#### 3.2.4.1. Preliminarno istraživanje utjecaja organskog otapala na kulturu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u tikvicama s odbijačima na tresilici

Istraživanje je provedeno s četiri različita otapala (3% i 10% vol/vol otapala). Tikvice s odbijačima (500 mL volumena) s 150 mL hranjive podloge su nakon sterilizacije u autoklavu (121 °C, 20 min) ohlađene i inokulirane s 15 mL inokuluma (točka 3.1.2.1.). Nakon uzimanja početnog kontrolnog nultog uzorka (0 h) u pojedine tikvice je dodano po 3% (4,95 mL) ili 10% (16,5 mL) pojedinog otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol, oleil alkohol). U kontrolnu tikvicu otapalo nije bilo dodano. Fermentacija je provedena na tresilici pri  $100 \text{ o min}^{-1}$  i

temperaturi 30 °C. Svakih sat vremena (sljedećih 8 sati), te nakon 24 sata su uzimani uzorci od jednog mililitra. Pripremljena su razrjeđenja ( $10^{-3}$  i  $10^{-4}$ ) sukcesivnim pipetiranjem u epruvete s 9 mL sterilne demineralizirane vode. Treće i četvrto razrjeđenje je nacijepljeno na sladni agar u Petrijeve zdjelice i određen je broj živih stanica (točka 3.2.1.3). Paralelno, uzeto je 4 mL uzorka za analizu optičke gustoće (koncentracije biomase). Uzgoj kvasca u tikvicama s odbijačima na tresilici prikazan je na slici 3.3.

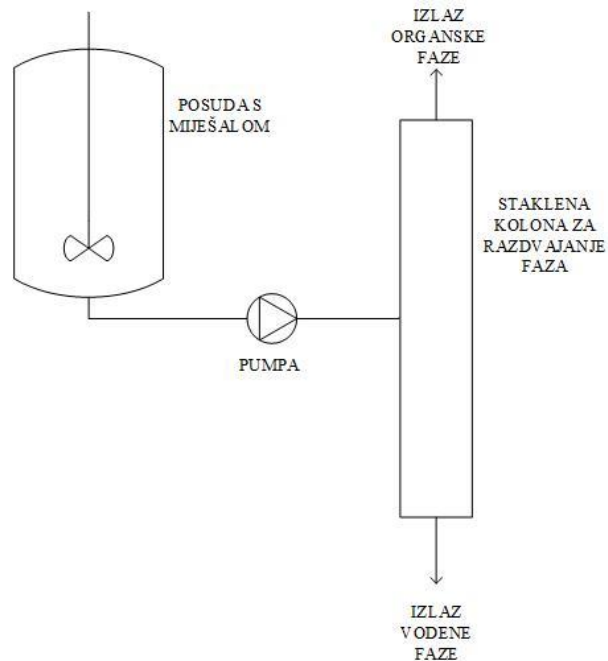


**Slika 3.3.** Uzgoj kvasca na tresilici.

### 3.2.5. Ispitivanje ekstraktivnih i razdjelnih svojstava ekstraktanata u sustavu za kontinuiranu ekstrakciju

Za provedbu istraživanja uspješnosti kontinuirane ekstrakcije korištena je aparatura opisana u točki 3.1.3.2. U posudu ekstrakcijskog uređaja stavljena je 8%-tna (vol/vol) vodena otopina etanola, te je u svakom pokusu dodano 10 % (vol/vol) pojedinog otapala (ekstraktanta). Kolona je spojena s posudom za miješanje cijevima koje su preko peristaltičke pumpe povezane sa srednjom sekcijom vertikalne kolone za razdvajanje ekstrakta od rafinata.

Stupnjevito je reguliran broj okretaja (150 – 230 rpm), vizualno je praćen nestanak sloja otapala i njegovo dispergiranje u vodenoj fazi. Za postojeće brojeve okretaja izračunati su Reynoldsovi brojevi miješala prema jednadžbi [13]. Uz intenzivno miješanje otopina je prepumpavana u kolonu za razdvajanje različitim protocima (0,98 L/h i 2,04 L/h). U koloni je vizualno praćeno razdvajanje ekstrakta od rafinata, pojava suspenzije i pjene, a kemijskom analizom (plinska kromatografija, točka 3.1.3.1.) određeni su sastavi ekstrakta i rafinata. Testirano je pri kojoj brzini okretaja se dobiva homogena otopina u sekciji za miješanje. Određen je Reynoldsov broj strujanja prema jednadžbi [14]. Shema uređaja za testiranje ekstrakcije prikazana je na slici 3.4.



**Slika 3.4.** Shema uređaja za testiranje ekstrakcije etanola višim alkoholima.

Srednja linearna brzina strujanja ( $w_i$ ):

$$w_i = \frac{F}{A} \quad [11]$$

$$A = r^2 \pi \quad [12]$$

Reynoldsov broj miješala ( $Re_i$ ):

$$Re_i = \frac{N \cdot D^2 \cdot \rho}{\mu} \quad [13]$$

Reynoldsov broj strujanja ( $Re$ ):



$$Re = \frac{w_i \cdot D \cdot \rho}{\mu} \quad [14]$$

F = protok (m<sup>3</sup>/s)

A = površina poprečnog presjeka kolone (m<sup>2</sup>)

r = polumjer cijevi (m)

N = broj okretaja u minuti (o min<sup>-1</sup>)

D = promjer miješala za Re broj miješala; promjer kolone za Re broj strujanja (m)

ρ = gustoća smjese (kg m<sup>-3</sup>)

μ = dinamička viskoznost smjese (kg m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)

### 3.2.6. Izračun potrebnog broja stupnjeva ekstrakcije etanola organskim otapalima iz podloge

Sastav i količina ekstrakta i rafinata određuje se bilancama mase tvari. Za prvi stupanj ekstrakcije vrijedi:

Totalna bilanca mase:

$$m_F + m_B = m_{MI} = m_{EI} + m_{RI} \quad [15]$$

Bilanca mase ključne sastavnice:

$$m_F \cdot U_{c,F} + m_B \cdot U_{c,B} = m_{MI} \cdot U_{c,MI} = m_{EI} \cdot U_{c,EI} + m_{RI} \cdot U_{c,RI} \quad [16]$$

Udio ključne sastavnice u smjesi ekstraktanta i podloge:

$$U_{c,MI} = \frac{(m_F \cdot U_{c,F} + m_B \cdot U_{c,B})}{m_{MI}} \quad [17]$$

Odnos masa ekstrakta i rafinata:

$$\frac{m_R}{m_E} = \frac{U_{c,E} - U_{c,M}}{U_{c,M} - U_{c,R}} \quad [18]$$

gdje je:

m<sub>F</sub> = masa fermentirane podloge (kg)

m<sub>B</sub> = masa otapala (kg)

m<sub>M</sub> = masa mješavine (kg)

m<sub>E</sub> = masa ekstrakta (kg)

m<sub>R</sub> = masa rafinata (kg)

U<sub>c,M</sub> = maseni udio otopljene tvari (ključne sastavnice etanola) u mješavini

U<sub>c,F</sub> = maseni udio otopljene tvari (ključne sastavnice etanola) u podlozi

$U_{c,B}$  = maseni udio otopljene tvari (ključne sastavnice etanola) u otapalu

$U_{c,E}$  = maseni udio otopljene tvari (ključne sastavnice etanola) u ekstraktu

$U_{c,R}$  = maseni udio otopljene tvari (ključne sastavnice etanola) u rafinatu

Koristeći jednadžbe [15] – [18] i trokutne binodalne dijagrame, za pretpostavljenu količinu podloge s vjerojatnim sadržajem etanola, izračunate su količine ekstrahiranog etanola uz pretpostavku trostupanjske ekstrakcije i količine uporabljenog otapala 10 % (vol/vol). Proračuni su izvršeni za pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol.

$$F_{m,F} + F_{m,B} = F_{m,M} = F_{m,R} + F_{m,E} \quad [19]$$

$$F_{m,F} \cdot U_{c,F} + F_{m,B} \cdot U_{c,B} = F_{m,M} \cdot U_{c,M} \quad [20]$$

$$F_{m,F} \cdot U_{c,F} + (F_{m,M} - F_{m,F}) \cdot U_{c,B} = F_{m,M} \cdot U_{c,M} \quad [21]$$

$$F_{m,F} \cdot (U_{c,F} - U_{c,B}) = F_{m,M} \cdot (U_{c,M} - U_{c,B}) \quad [22]$$

$$\frac{F_{m,F}}{F_{m,M}} = \frac{U_{c,M} - U_{c,B}}{U_{c,F} - U_{c,B}} = \frac{\text{dužina } M-B}{\text{dužina } F-B} \quad [23]$$

$$F_{m,F} \cdot U_{c,F} + F_{m,B} \cdot U_{c,B} = (F_{m,F} + F_{m,B}) \cdot U_{c,M} \quad [24]$$

$$F_{m,F} \cdot (U_{c,F} - U_{c,M}) = F_{m,B} \cdot (U_{c,M} - U_{c,B}) \quad [25]$$

$$\frac{F_{m,B}}{F_{m,F}} = \frac{U_{c,F} - U_{c,M}}{U_{c,M} - U_{c,B}} = \frac{\text{dužina } F-M}{\text{dužina } M-B} \quad [26]$$

$$(F_{m,B})_{\min} = F_{m,F} \cdot \frac{F_{m,B}}{F_{m,F}} \quad [27]$$

$$U_{c,F} \cdot F_{m,F} + U_{c,B} \cdot F_{m,B} = U_{c,M} \cdot F_{m,M} \quad [28]$$

gdje je:

$F_{m,F}$  = protok fermentirane podloge ( $\text{kg h}^{-1}$ )

$F_{m,B}$  = protok otapala ( $\text{kg h}^{-1}$ )

$F_{m,M}$  = protok mješavine ( $\text{kg h}^{-1}$ )

$F_{m,E}$  = protok ekstrakta ( $\text{kg h}^{-1}$ )

$F_{m,R}$  = protok rafinata ( $\text{kg h}^{-1}$ )

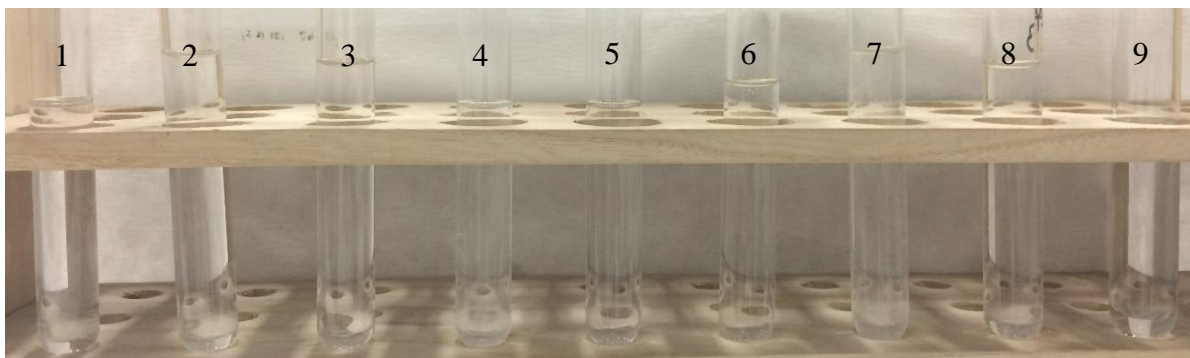
Jednadžbe [19] – [27] korištene su za dobivanje minimalnog protoka otapala, a jednadžba [28] korištena je za izračunavanje udjela etanola u mješavini, te su pomoću tog podatka grafički određeni udjeli etanola u ekstraktu i rafinatu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

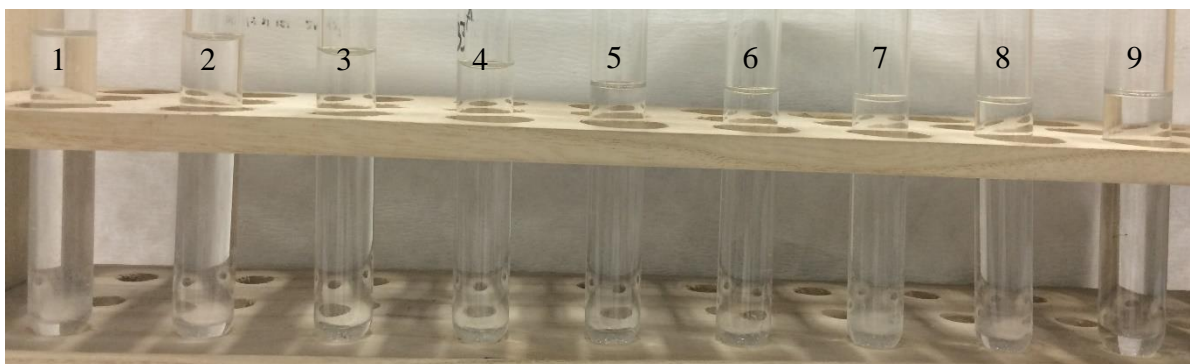
### 4.1. IZBOR POGODNOG ORGANSKOG OTAPALA ZA IZDVAJANJE ETANOLA

#### 4.1.1. Preliminarno istraživanje ponašanja dvokomponentnih smjesa

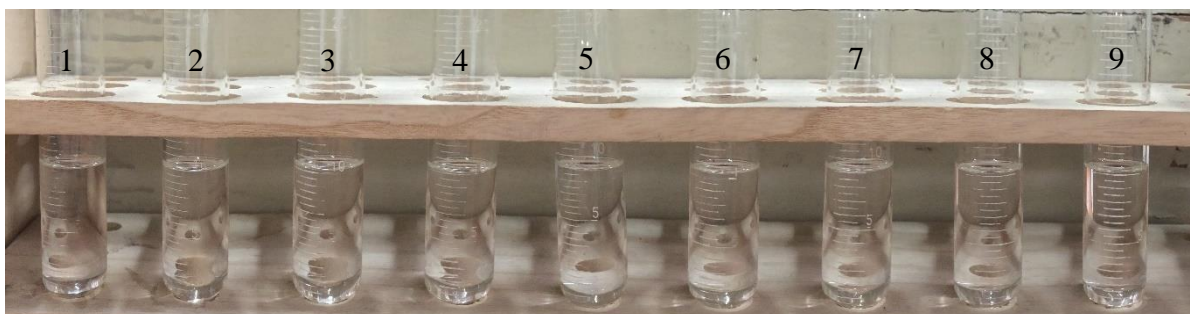
Rezultati istraživanja ponašanja dvokomponentnih smjesa organsko otapalo/etanol i organsko otapalo/voda prikazani su na slikama 4.1. - 4.5. Voda i etanol se miješaju u potpunosti pa rezultati nisu prikazani.



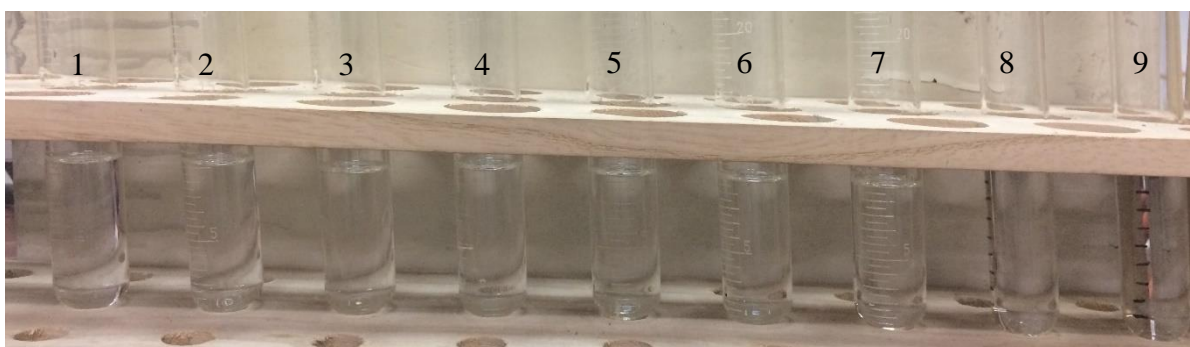
**Slika 4.1.** Međusobna topivost (mješljivost) pentan-1-ola i etanola u raznim volumnim omjerima (1) 1:9, (2) 2:8, (3) 3:7, (4) 4:6, (5) 5:5, (6) 6:4, (7) 7:3, (8) 8:2, (9) 9:1.



**Slika 4.2.** Međusobna topivost (mješljivost) oktan-1-ola i etanola u raznim volumnim omjerima (1) 1:9, (2) 2:8, (3) 3:7, (4) 4:6, (5) 5:5, (6) 6:4, (7) 7:3, (8) 8:2, (9) 9:1.

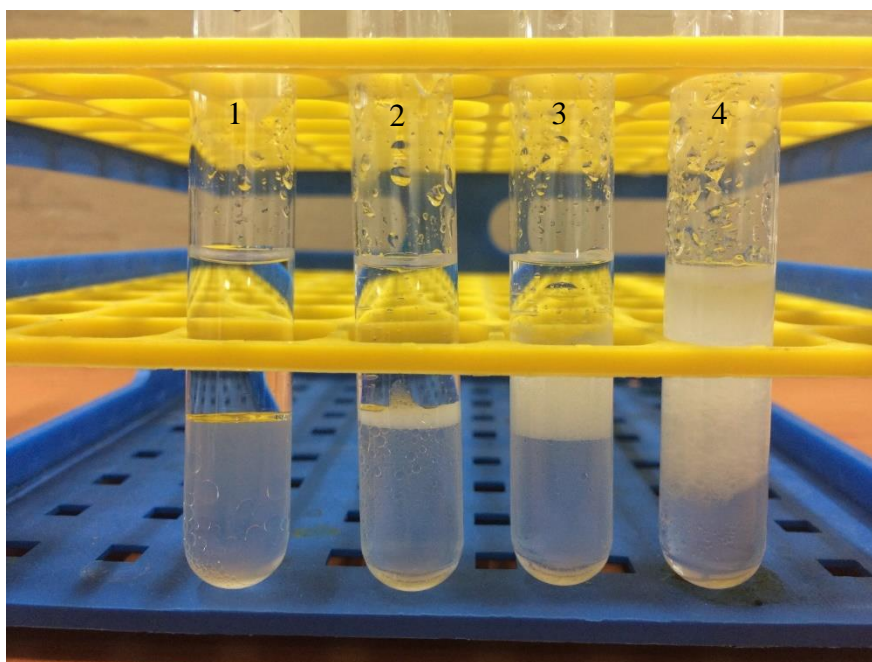


**Slika 4.3.** Međusobna topivost (mješljivost) nonan-1-ola i etanola u raznim volumnim omjerima (1) 1:9, (2) 2:8, (3) 3:7, (4) 4:6, (5) 5:5, (6) 6:4, (7) 7:3, (8) 8:2, (9) 9:1.



**Slika 4.4.** Međusobna topivost (mješljivost) oleil alkohola i etanola u raznim volumnim omjerima (1) 9:1, (2) 8:2, (3) 7:3, (4) 6:4, (5) 5:5, (6) 4:6, (7) 3:7, (8) 2:8, (9) 1:9.

Na slikama 4.1. – 4.4. jasno se vidi da u istraživanim omjerima ta otapala zajedno s etanolom u širokom koncentracijskom rasponu daju homogenu smjesu. Takav rezultat pokazuje da sva istraživana otapala ne daju emulzije, te da mogu poslužiti za ekstrakciju etanola zbog njihove međusobno dobre mješljivosti u širokom rasponu koncentracija. No takav sustav se još dodatno treba testirati i u prisutnosti treće komponente – vode (kao glavnog otapala sadržanog u fermentiranoj podlozi).

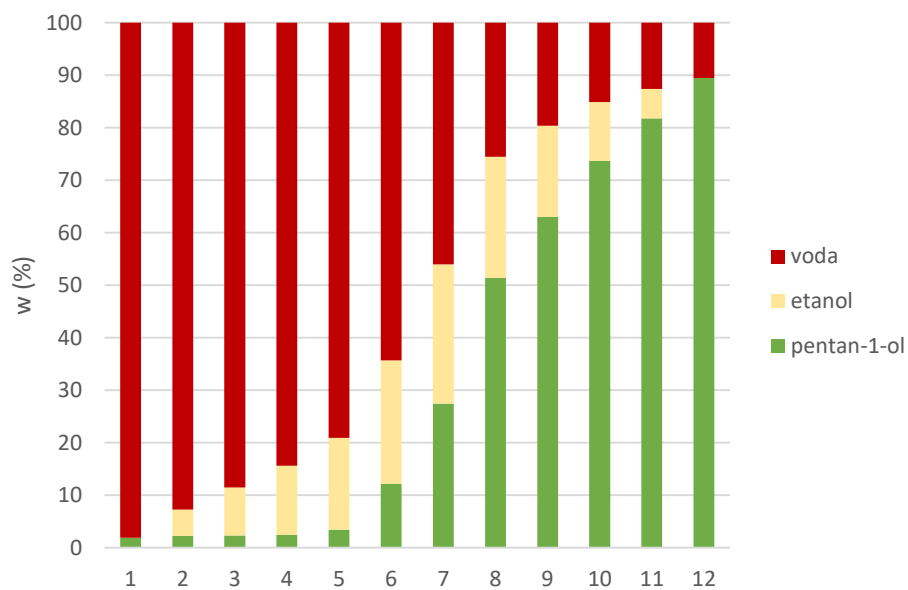


**Slika 4.5.** Međusobna topivost (mješljivost) vode i organskih otapala (ekstraktanata) smiješanih u volumnom omjeru 1:1, (1) pentan-1-ol:voda, (2) nonan-1-ol:voda, (3) oktan-1-ol:voda, (4) oleil alkohol:voda.

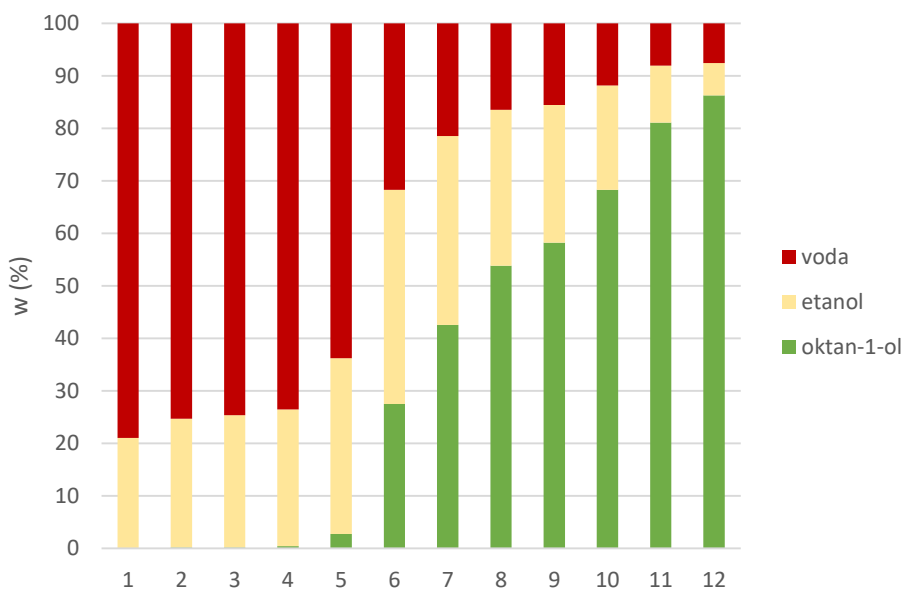
Na slici 4.5. prikazani su rezultati intenzivnog miješanja vode i potencijalnih ekstraktanata. Na spomenutoj slici se jasno vidi da pentan-1-ol i nonan-1-ol stvaraju dva dobro odvojena sloja koji ne pokazuju pojavu emulzijske zone, nasuprot tome oktan-1-ol s vodom daje dobro razdvojene slojeve, ali i pojas emulzijske zone između gornje (organske) i donje (vodene) faze. Oleil alkohol s vodom pak stvara izrazitu emulziju kojoj je potrebno više od 24 sata da se razdvoji u organsku i vodenu fazu.

#### 4.1.2. Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesa i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama

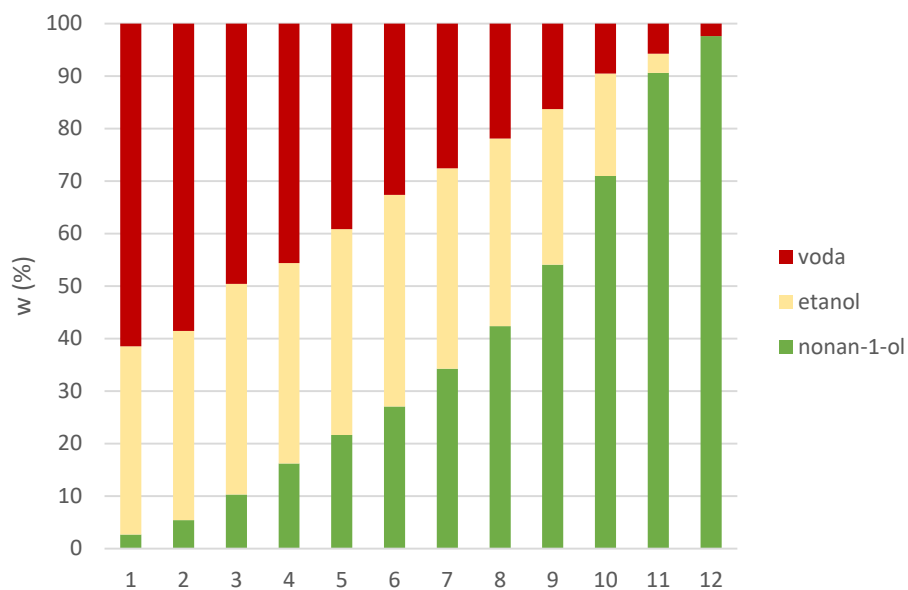
Rezultati istraživanja ponašanja trojnih sustava organsko otapalo/etanol/voda prikazani su na slikama 4.6. - 4.9. Sve smjese nastale miješanjem količina prikazanih na tim slikama su bile homogene, a dobiveni podaci korišteni su za izradu trokomponentnih trokutnih dijagrama.



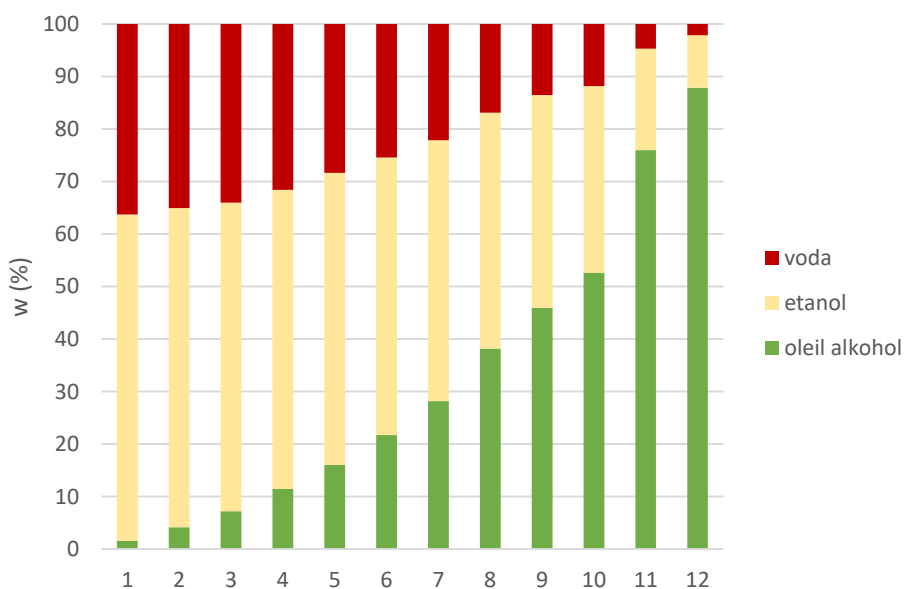
**Slika 4.6.** Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (pentan-1-ol + etanol + voda) koji rezultiraju homogenom smjesom.



**Slika 4.7.** Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (oktan-1-ol + etanol + voda) koji rezultiraju homogenom smjesom.



**Slika 4.8.** Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (nonan-1-ol + etanol + voda) koji rezultiraju homogenom smjesom.



**Slika 4.9.** Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (oleil alkohol + etanol + voda) koji rezultiraju homogenom smjesom.

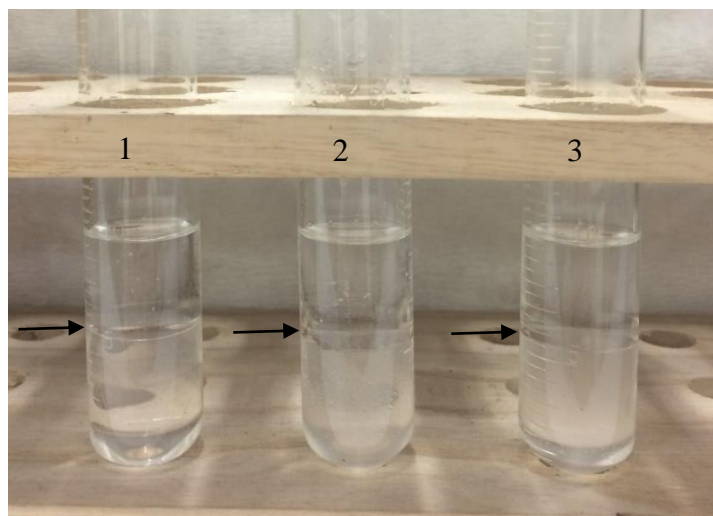
Važna svojstva otapala koje se koristi za ekstrakciju tekuće-tekuće je njeno sposobnost razdvajanja faza i što slabije nastajanje emulzija. Sustav koji stvara stabilne emulzije je nepovoljan za provođenje procesa ekstrakcije. Rezultati istraživanja trokomponentnih smjesa prikazani na slikama 4.6. – 4.9. pokazuju u kojim omjerima komponente stvaraju homogene

smjese. Trokomponentne smjese su istraživane zbog činjenice da u ekstraktivnim procesima i vrlo male količine pojedine komponente mogu bitno utjecati na ponašanje kompletne smjese. Tipičan primjer koji ilustrira tu tvrdnju jest primjena emulgatora u smjesama ulja i vode. Na slikama 4.6. – 4.9. je vidljivo da voda, etanol i svako od istraživanih organskih otapala imaju široki koncentracijski pojas međusobne potpune topivosti. Iz tog razloga trebalo je proširiti istraživane koncentracijske omjere na područje u kojem te tri komponente (voda + etanol + organsko otapalo) stvaraju dvije razdvojene smjese: vodenu fazu (otopina etanola i otapala s dominantnim udjelom vode) i organsku fazu (otopina vode i etanola u organskoj fazi).

#### 4.1.3. Ravnotežne koncentracije, razdjeljivanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese etanol-voda-organsko otapalo

Na slikama 4.10., 4.12., 4.14. i 4.16. prikazane su razdvojene ravnotežne faze (organska i vodena) nastale iz smjese pojedinog otapala (pentan-1-ola, oktan-1-ola, nonan-1-ola i oleil alkohola), etanola i vode nakon višekratnog miješanja i mirovanja (razdvajanja faza). Iz vodene faze (rafinat) i organske faze (ekstrakt) uzeti su uzorci koji su analizirani plinskom kromatografijom. Uzorak iz epruvete 2 sa slike 4.14. (nonan-1-ol, etanol, voda) nije analiziran jer je nastala emulzija, tj. nije došlo do potpunog razdvajanja faza. Rezultati plinsko kromatografske analize prikazani su u tablicama 4.1. - 4.4. Maseni udjeli etanola kao ključne sastavnice i maseni udjeli vode te organskog otapala u pojedinim fazama (ekstrakt i rafinat) prikazani su u tablicama 4.1. - 4.4. Ti podaci su iskorišteni za izradu ravnotežne binodalne linije u trokutnim trokomponentnim dijagramima (Slika 4.11., 4.13., 4.15. i 4.17.).

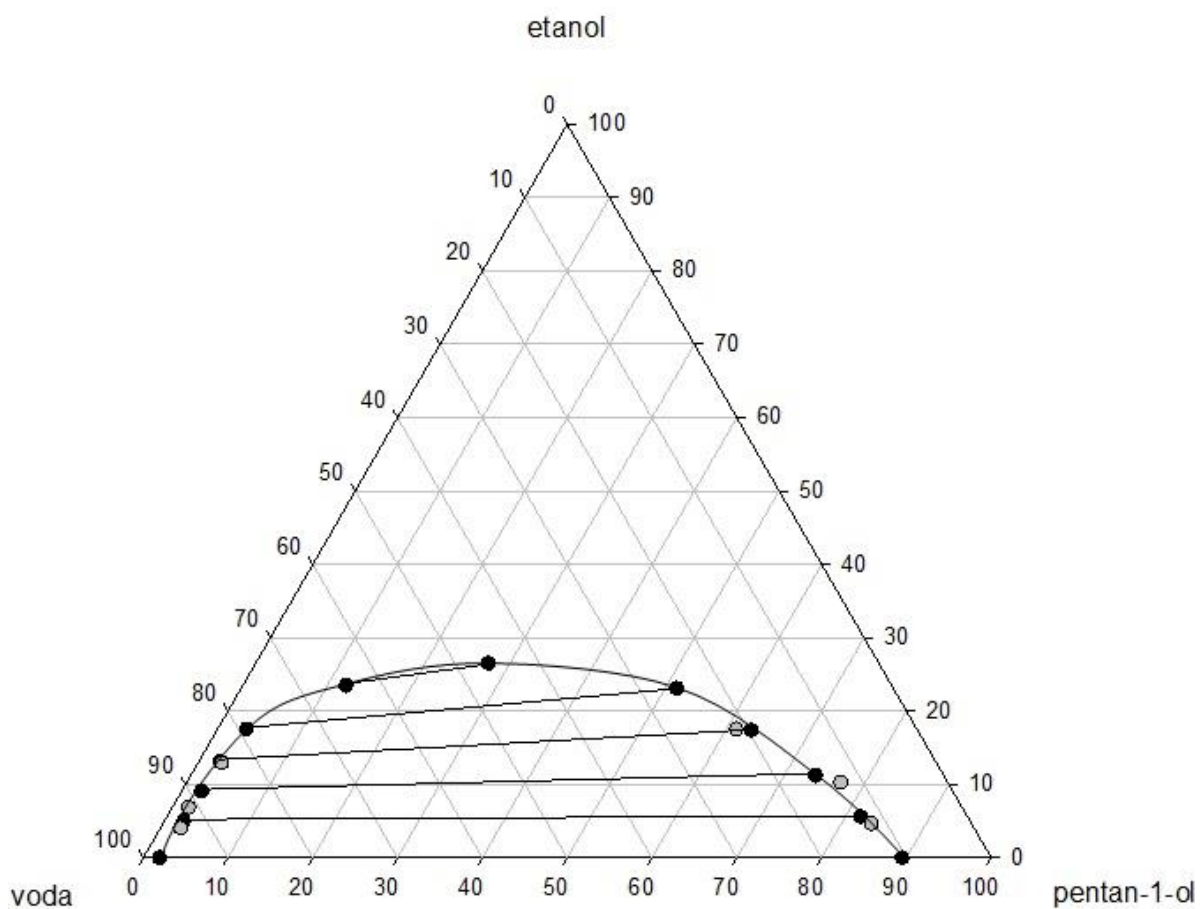




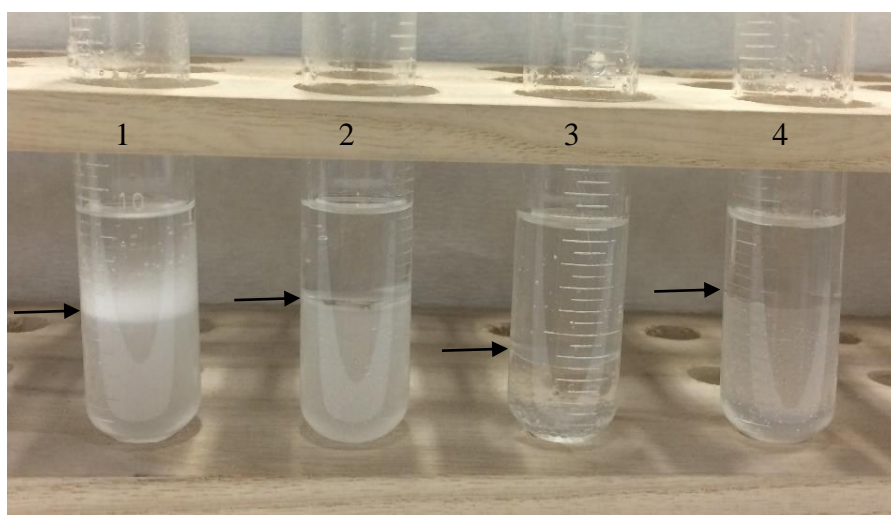
**Slika 4.10.** Razdvajanje faza trokomponentnih nehomogenih smjesa pentan-1-ola, vode i etanola različitih omjera: (1) 40:55:5, (2) 40:50:10, (3) 30:50:20 (strelicom je prikazana granica faza).

**Tablica 4.1.** Rezultati plinsko kromatografske analize.

<b>Ekstrakt</b>			<b>Rafinat</b>		
<b>W<sub>pentan-1-ol</sub> (%)</b>	<b>W<sub>voda</sub> (%)</b>	<b>W<sub>etanol</sub> (%)</b>	<b>W<sub>pentan-1-ol</sub> (%)</b>	<b>W<sub>voda</sub> (%)</b>	<b>W<sub>etanol</sub> (%)</b>
83,54	11,78	4,68	2,41	93,54	4,05
77,14	12,58	10,28	1,95	91,20	6,85
61,19	21,30	17,51	2,82	84,24	12,94



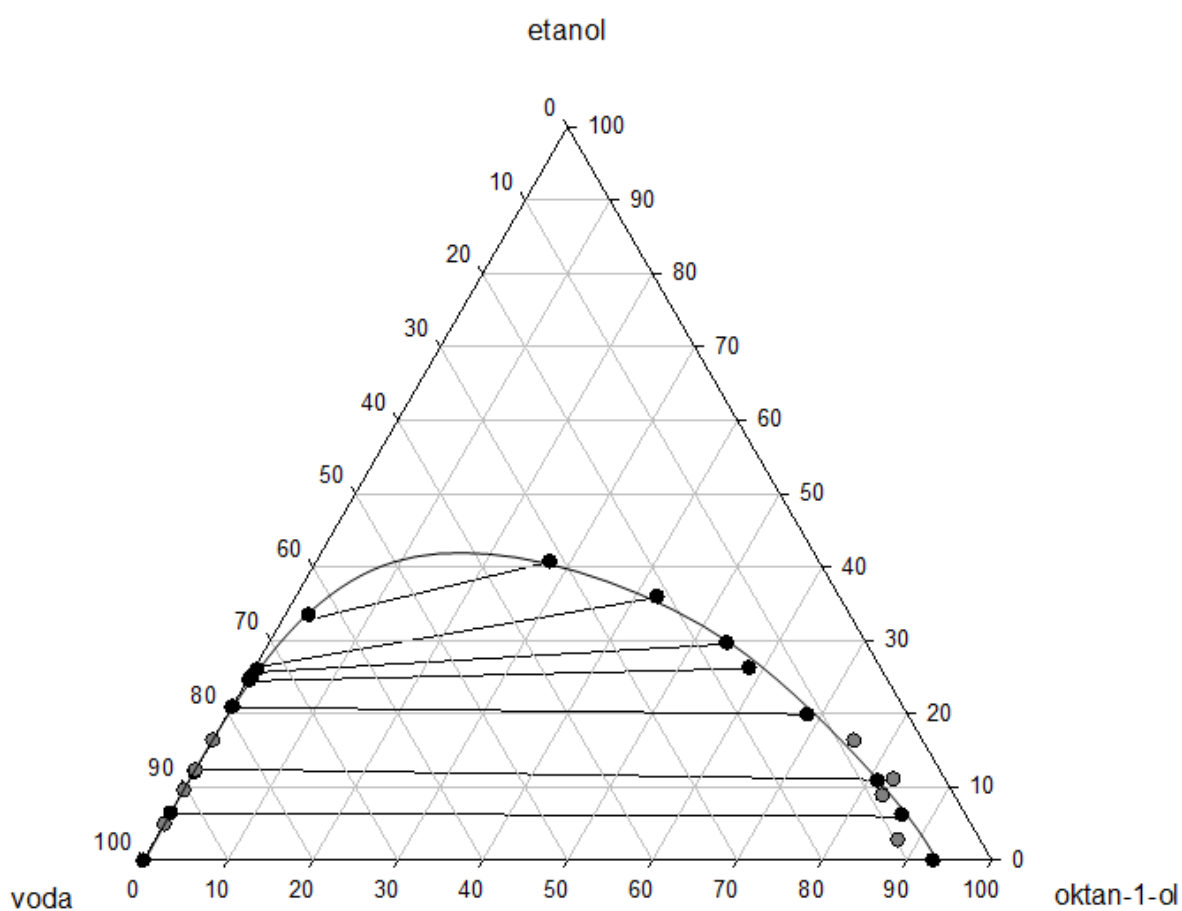
**Slika 4.11.** Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu pentan-1-ol/etanol/voda. Legenda: (○) dobiveno eksperimentalno, (●) preuzeto iz rada Rahman i sur., (2001).



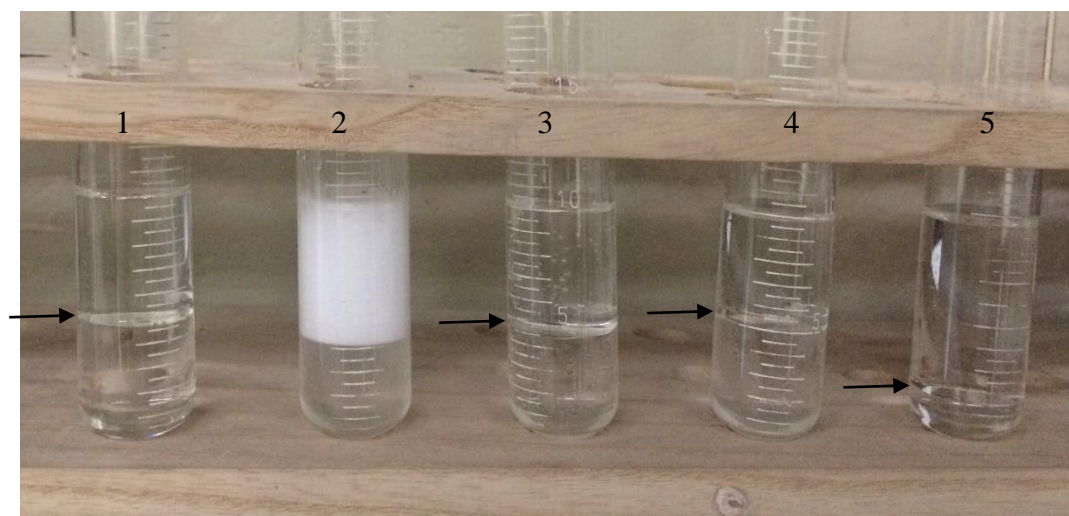
**Slika 4.12.** Razdvajanje faza trokomponentnih nehomogenih smjesa oktan-1-ola, vode i etanola različitih omjera: (1) 40:55:5, (2) 40:50:10, (3) 50:35:15, (4) 30:50:20 (strelicom je prikazana granica faza).

**Tablica 4.2.** Rezultati plinsko kromatografske analize.

Ekstrakt			Rafinat		
Woktan-1-ol (%)	Wvoda (%)	Wetanol (%)	Woktan-1-ol (%)	Wvoda (%)	Wetanol (%)
87,49	9,72	2,79	0,00	95,06	4,94
82,65	8,5	8,85	0,00	90,43	9,57
75,59	8,10	16,31	0,00	83,62	16,38
27,53	31,71	40,76	2,73	63,80	33,47

**Slika 4.13.** Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu oktan-1-ol/etanol/voda. Legenda:

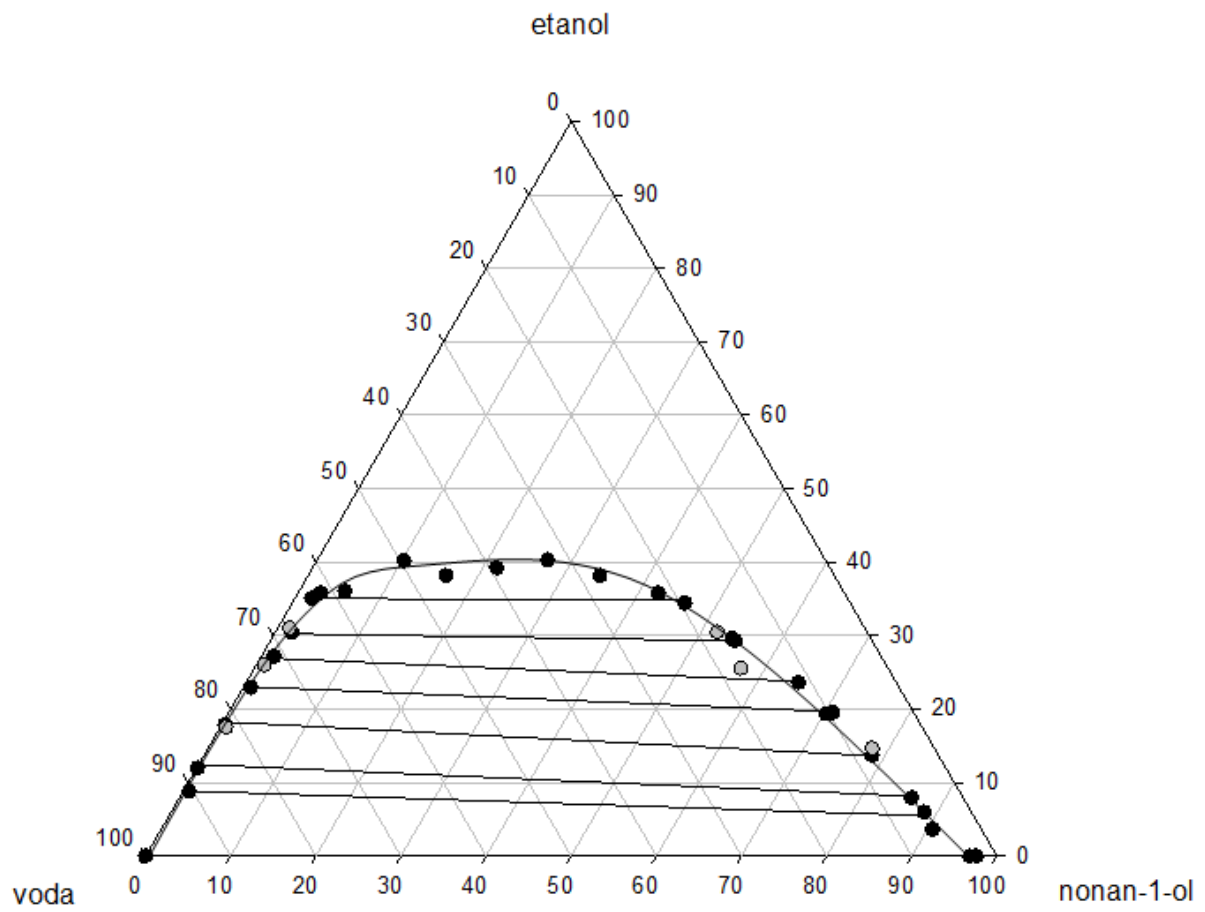
(◦) dobiveno eksperimentalno, (●) preuzeto iz rada Arce i sur., (1994).



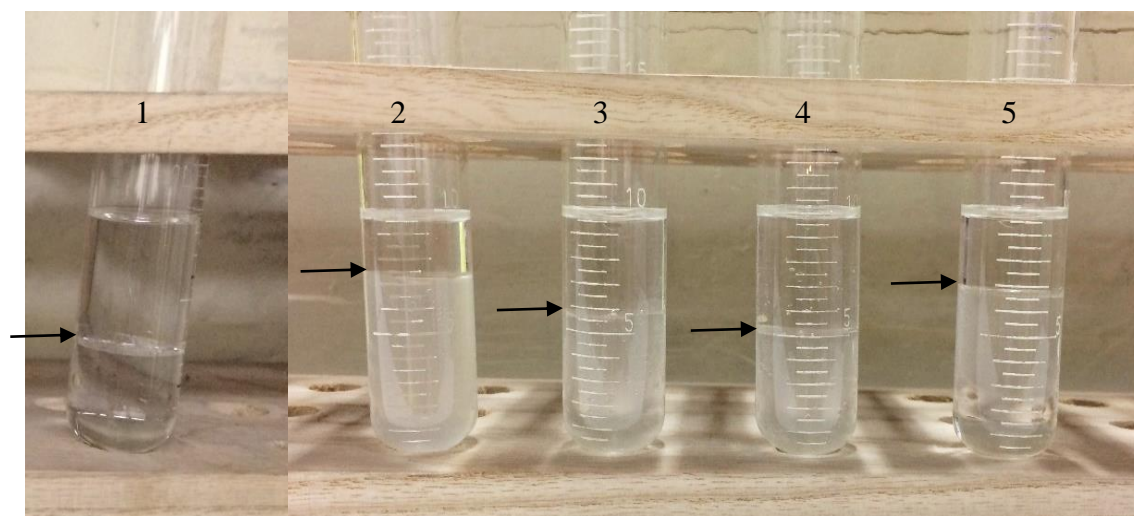
**Slika 4.14.** Razdvajanje faza trokomponentnih nehomogenih smjesa nonan-1-ola, vode i etanola različitih omjera: (1) 27:36:37, (2) 40:53:7, (3) 47:38:15, (4) 40:40:20, (5) 50:20:30 (strelicom je prikazana granica faza).

**Tablica 4.3.** Rezultati plinsko kromatografske analize.

<b>Ekstrakt</b>			<b>Rafinat</b>		
<b>W<sub>nonan-1-ol</sub> (%)</b>	<b>W<sub>voda</sub> (%)</b>	<b>W<sub>etanol</sub> (%)</b>	<b>W<sub>nonan-1-ol</sub> (%)</b>	<b>W<sub>voda</sub> (%)</b>	<b>W<sub>etanol</sub> (%)</b>
51,89	17,63	30,48	1,40	67,60	31,00
57,13	17,30	25,57	0,93	73,06	26,01
70,22	10,43	19,35	0,89	76,17	22,94
78,03	7,34	14,63	0,64	81,84	17,52



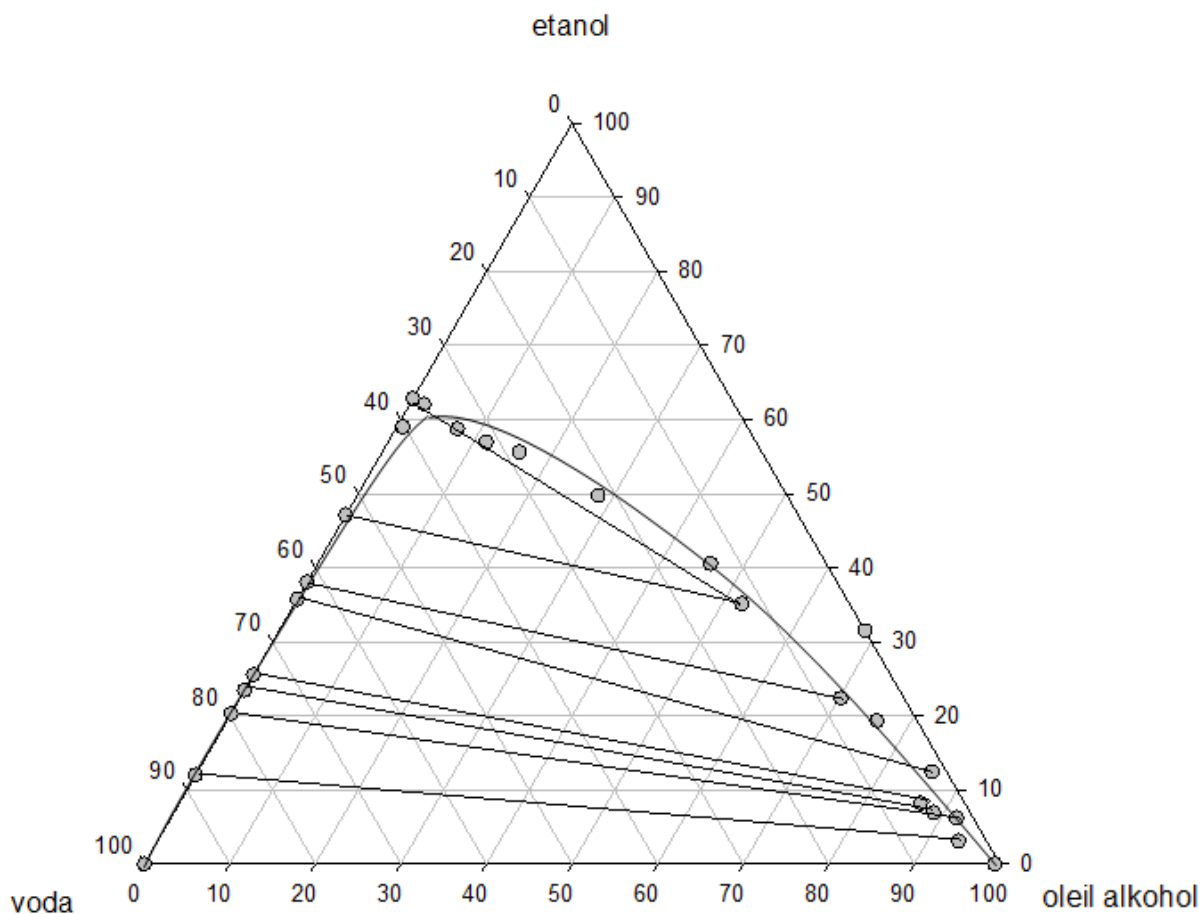
**Slika 4.15.** Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu nonan-1-ol/etanol/voda. Legenda:  
(○) dobiveno eksperimentalno, (●) preuzeto iz rada Kirbaslar i sur., (2000).



**Slika 4.16.** Razdvajanje faza trokomponentnih nehomogenih smjesa oleil alkohol, vode i etanola različitih omjera: (1) 30:20:50, (2) 20:40:40, (3) 30:30:40, (4) 40:30:30, (5) 20:30:50 (strelicom je prikazana granica faza).

**Tablica 4.4.** Rezultati plinsko kromatografske analize.

<b>Ekstrakt</b>			<b>Rafinat</b>		
<b>Woleil (%)</b>	<b>Wvoda (%)</b>	<b>Wetanol (%)</b>	<b>Woleil (%)</b>	<b>Wvoda (%)</b>	<b>Wetanol (%)</b>
52,27	12,59	35,14	0,00	37,16	62,84
70,24	7,40	22,36	0,00	61,95	38,05
68,52	0,00	31,48	0,00	47,11	52,89



**Slika 4.17.** Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu oleil alkohol/etanol/voda.

Slike 4.10., 4.12., 4.14. i 4.16. prikazuju da istraživane otopine (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol, oleil alkohol) u širokom pojasu masenih udjela u statičkom sustavu stvaraju dva jasno odvojena sloja (ekstrakt i rafinat). Takav rezultat upućuje da se sva istraživana otapala mogu u tehnološkom procesu dobro razdvojiti od vodene faze što je preduvjet za uspješan rad postrojenja za ekstrakciju. Slike binodalnih dijagrama (4.11., 4.13., 4.15. i 4.17.) pokazuju da trokomponentne smjese (pojedino organsko otapalo + etanol + voda) imaju široko područje koncentracijskih omjera u kojima stvaraju dvije razdvojene faze (ekstrakt i rafinat) što je također preduvjet za uspješnu ekstrakciju. Međusobnom usporedbom dobivenih binodalnih dijagrama može se vidjeti da najširi raspon koncentracija u smjesi koje rezultiraju homogenom trokomponentnom otopinom ima sustav pentan-1-ol/etanol/voda. Slijede ga sustavi oktan-1-ol/etanol/voda i nonan-1-ol/etanol/voda čije koncentracijsko područje stvaranja nehomogenih smjesa je šire od onih koje ima sustav pentan-1-ol/etanol/voda. Najšire područje koncentracijskih omjera komponenti u kojem nastaje razdvajanje faza na ekstrakt i rafinat ima

sustav oleil alkohol/etanol/voda. Takvi rezultati svrstavaju otapala po pogodnosti za ekstrakciju etanola iz vodenih fermentiranih podloga (obzirom na širinu primjenjivog koncentracijskog pojasa) u redosljed: oleil alkohol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i pentan-1-ol. Izračunati su koeficijenti raspodjele i faktor separacije, rezultati su prikazani u tablici 4.5.

**Tablica 4.5.** Koeficijenti raspodjele za etanol  $K_{DE}$  i vodu  $K_{DW}$  te faktor separacije  $\alpha$ .

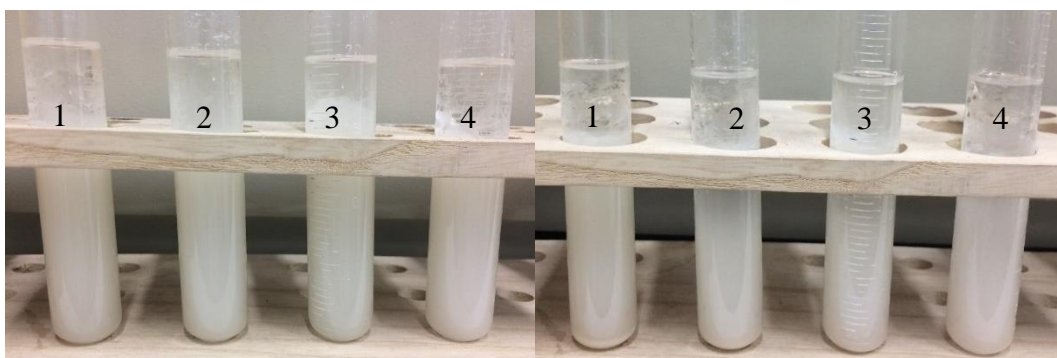
otapalo	Sastav organske faze		Sastav vodene faze		$K_{DE}$	$K_{DW}$	$\alpha$
	Wetanol (% vol/vol)	Wvoda (% vol/vol)	Wetanol (% vol/vol)	Wvoda (% vol/vol)			
pentan-1-ol	5	9,6	4,4	93,6	1.14	0.10	11.08
	10,8	11,2	9	88,6	1.20	0.13	9.49
	20	15	16	81	1.25	0.19	6.75
	26,7	22,2	74,4	74,4	1.28	0.30	4.30
	29,8	32,60	70	70	1.29	0.47	2.77
oktan-1-ol	0,00	100	0,00	6,96	0.96	0.08	11.89
	6,46	93,54	6,19	7,54	0.90	0.09	9.79
	12,08	87,92	10,86	8,07	0.95	0.15	6.32
nonan-1-ol	30,48	17,63	31,00	67,60	0.98	0.26	3.77
	14,63	7,34	17,52	81,84	0.83	0.09	9.31
	25,57	17,30	26,01	73,06	0.98	0.24	4.15
oleil alkohol	22,36	7,40	38,05	61,95	0.59	0.12	4.92
	0,89	0,87	4,3	95,7	0.21	0.01	22.77
	0,65	0,76	3,27	96,73	0.20	0.01	25.30
	0,42	0,66	2,18	97,82	0.19	0.01	28.55



## 4.2. ISTRAŽIVANJE UČINKOVITOSTI RAZDVAJANJA ORGANSKE FAZE

### 4.2.1. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge (voda i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*)

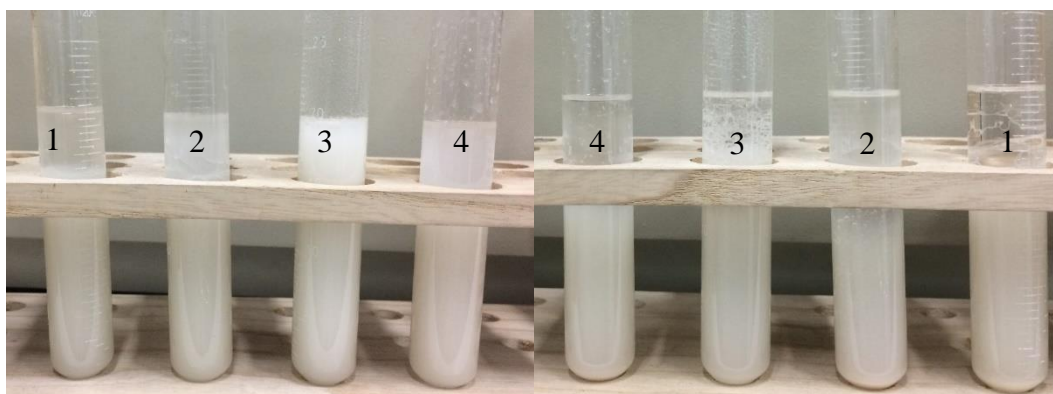
Na slici 4.18. je prikazano razdvajanje organske i vodene faze u prisutnosti radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*).



**Slika 4.18.** Razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) odmah nakon miješanja (lijevo) te nakon 4 sata (desno). Uporabljeni ekstraktanti: (1) pentan-1-ol, (2) oleil alkohol, (3) nonan-1-ol, (4) oktan-1-ol.

Kao što je već rečeno svaka dodatna komponenta u nehomogenim smjesama kemijski različitih otapala (u ovom slučaju vode i pojedinog organskog otapala) može bitno utjecati na razdvajanje faza i na vladanje kompletnih sustava. Zbog toga je proveden pokus čiji su rezultati prikazani na slici 4.18. u kojem je tretirano ponašanje radnog mikroorganizma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u sustavu organsko otapalo/voda. Rezultati prikazani na slici 4.18. pokazuju da stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* imaju jaku tendenciju prema vodenoj (težoj) fazi dok se u lakšem (gornjem) sloju organskog otapala nalazi vrlo mali broj stanica. Takav rezultat za sva otapala indicira da u eventualnoj uporabi otapala za direktnu ekstrakciju u bioreaktoru (koji bi funkcionirao kao homogenizator organske i vodene faze) otapalo može biti primijenjeno jer će nakon napuštanja reaktora u sustavu za razdvajanje faza radni mikroorganizam pretežito biti koncentriran u vodenoj fazi. Ta vodena faza bi se mogla zbog takvih svojstava iskoristiti kao povratni tok za vraćanje radnog mikroorganizma u reaktor.

Na slici 4.19. je prikazano razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) i etanola u smjesi.

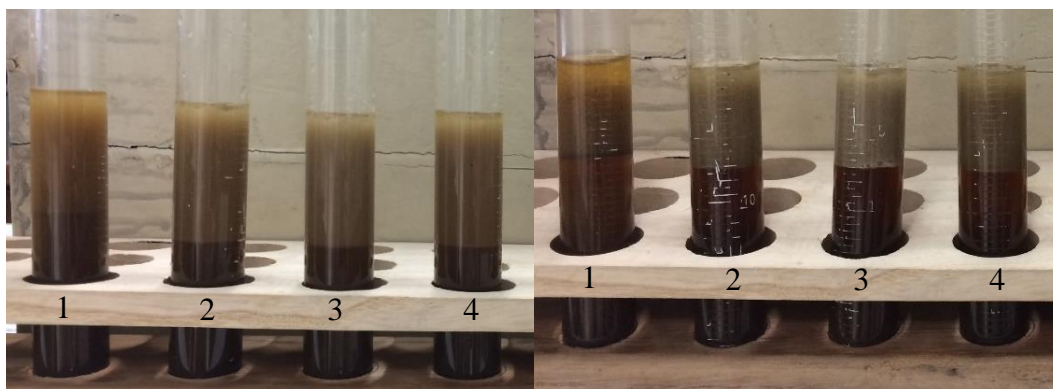


**Slika 4.19.** Razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) i etanola odmah nakon miješanja (lijevo) te nakon 4 sata (desno). Uporabljene ekstraktanti: (1) pentan-1-ol, (2) oleil alkohol, (3) nonan-1-ol, (4) oktan-1-ol.

Slika 4.19. također prikazuje da stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* imaju jaku tendenciju prema vodenoj fazi, čak i uz prisutnost etanola u hranjivoj podlozi. Razdvajanje je nešto bolje u odnosu na prethodni pokus. Ovim pokusom je potvrđeno da bi se vodena faza iz takvog sustava mogla iskoristiti za povratni tok jer su u gornjem sloju stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prisutne u jako malom broju.

#### 4.2.2. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge (hidrolizat lignoceluloznog kompleksa i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*)

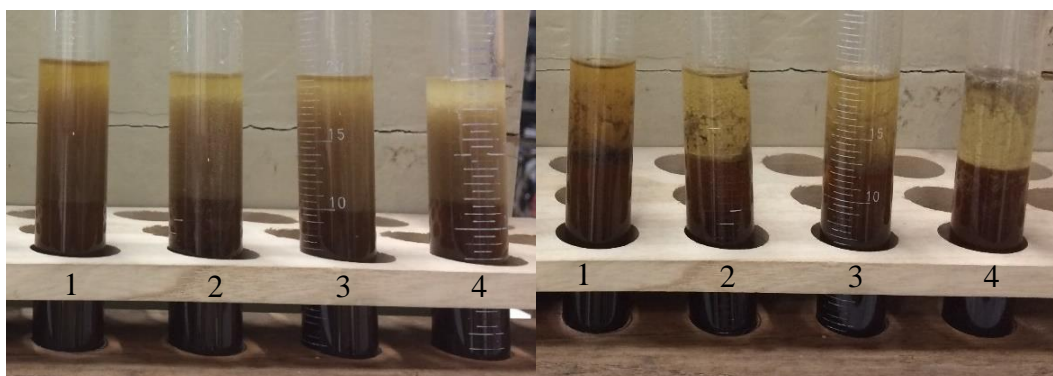
Na slici 4.20. je prikazano razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost hidrolizata lignoceluloznog kompleksa (tretiranog s  $H_2SO_4$ ) i radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) u smjesi. Uzet je uzorak iz organske faze nakon 4 sata te je brojanjem stanica u Thomaovoj komori utvrđeno da u hidrolizatu nema kvašćevih stanica.



**Slika 4.20.** Razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) i hidrolizata lignoceluloznog kompleksa odmah nakon miješanja (lijevo) te nakon 4 sata (desno). Uporabljene ekstraktanti: (1) pentan-1-ol, (2) nonan-1-ol, (3) oleil alkohol, (4) oktan-1-ol.

Slika 4.20. pokazuje da se sustav u kojem je prisutan hidrolizat lignoceluloznog kompleksa ponaša drugačije od sustava voda/otapalo (Slika 4.18.) Nakon 4 sata mirovanja primjetna je značajna mutež organske faze i to za sva primijenjena otapala. Pregledom organske faze u Thomaovoj komori pod mikroskopom nađeno je da u toj organskoj fazi nakon 4 sata mirovanja praktički nema stanica. To upućuje na zaključak da se u prisustvu hidrolizata lignoceluloznog kompleksa u organskoj fazi stvore emulzije koje se sporo razdvajaju.

Na slici 4.21. je prikazano razdvajanje organske i vodene faze u prisutnosti hidrolizata lignoceluloznog kompleksa (tretiranog s  $H_2SO_4$ ), radnog mikroorganizma (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) i etanola.

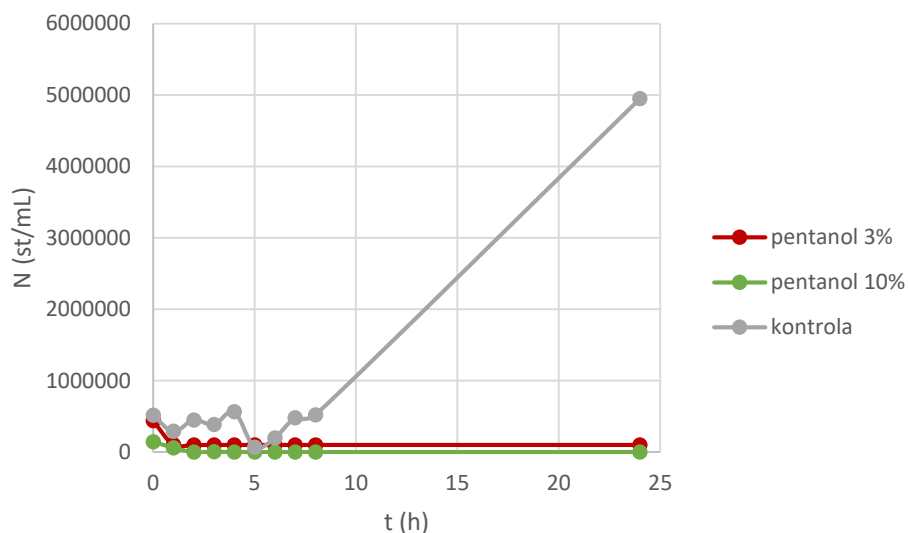


**Slika 4.21.** Razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost radnog mikroorganizma (*Saccharomyces cerevisiae*), hidrolizata lignoceluloznog kompleksa i etanola odmah nakon miješanja (lijevo) te nakon 4 sata (desno). Uporabljeni ekstraktanti: (1) pentan-1-ol, (2) nonan-1-ol, (3) oktan-1-ol, (4) oleil alkohol.

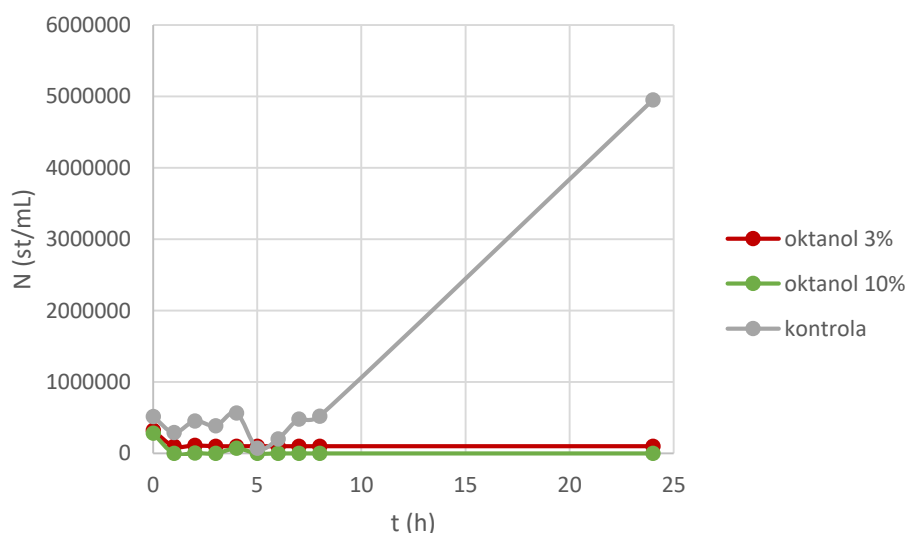
Obzirom na rezultate prikazane na slici 4.20. bilo je interesantno vidjeti da li će etanol kao komponenta fermentirane hranjive podloge bitno utjecati na ponašanje sustava koji se sastoji od organskog otapala (ekstraktanta), stanica kvasca i hidrolizata lignoceluloznog kompleksa. Rezultati na slici 4.21. jasno pokazuju da etanol u takvom sustavu smanjuje mogućnost nastanka emulzije u organskoj fazi što je vidljivo po bistrom gornjem sloju u epruvetama 1-4 desno. I u ovom slučaju stanice kvasca su nakon 4 sata mirovanja bile vrlo pretežito sadržane u težoj vodenoj fazi. Ta činjenica je potvrđena i pregledom obiju faza svjetlosnim mikroskopom i brojanjem stanica u Thomaovoj komorici.

### 4.3.PRELIMINARNO ISTRAŽIVANJE UTJECAJA OTAPALA (PENTAN-1-OL, OKTAN-1-OL, NONAN-1-OL ILI OLEIL ALKOHOL) NA RAST KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* U TIKVICAMA NA TRESILICI

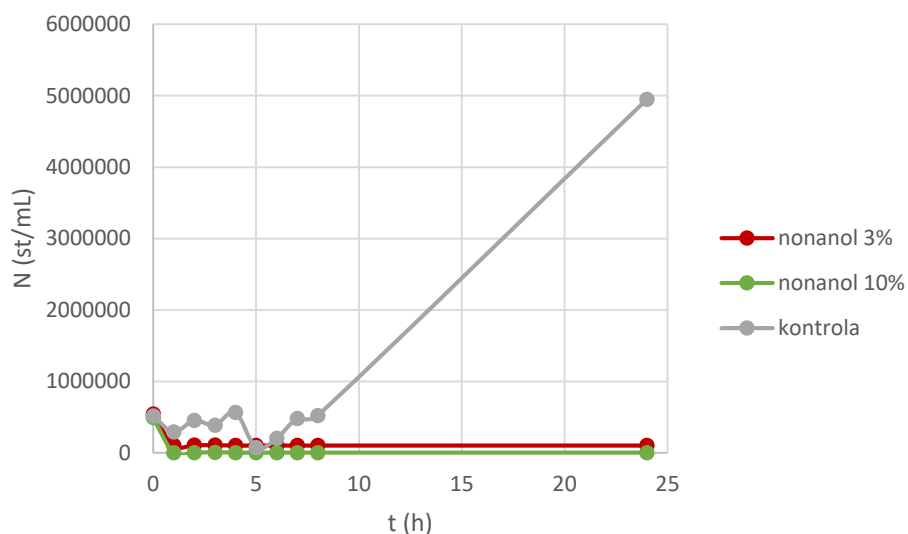
Rezultati djelovanja otapala na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u eksponencijalnoj fazi rasta, prikazani su na slikama 4.22. – 4.25.



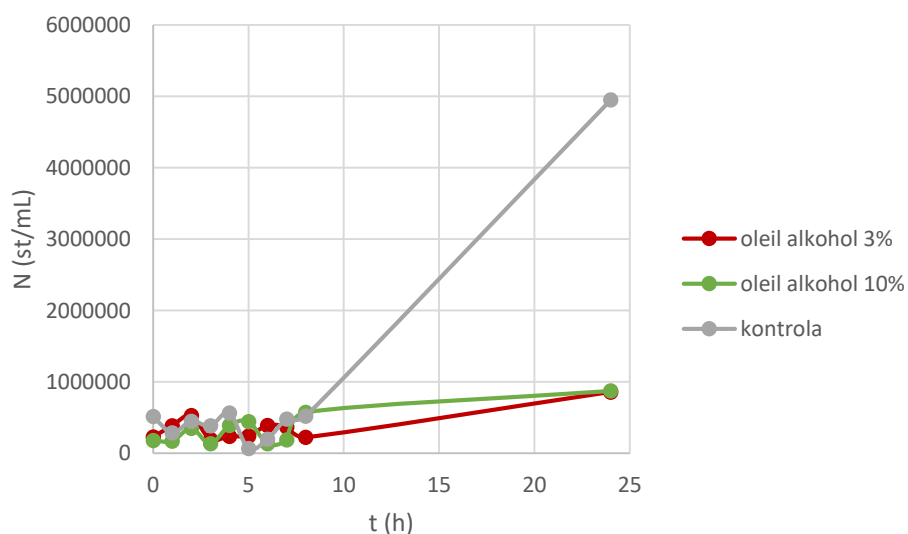
**Slika 4.22.** Promjena broja živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (N) tijekom šaržnog uzgoja na tresilici u prisutnosti 3% i 10% (vol/vol) pentan-1-ola.



**Slika 4.23.** Promjena broja živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (N) tijekom šaržnog uzgoja na tresilici u prisutnosti 3% i 10% vol/vol oktanol-1-ola.



**Slika 4.24.** Promjena broja živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (N) tijekom šaržnog uzgoja na tresilici u prisutnosti 3% i 10% vol/vol nonan-1-ola.



**Slika 4.25.** Promjena broja živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (N) tijekom šaržnog uzgoja na tresilici u prisutnosti 3% i 10% vol/vol oleil alkohola.

U slučaju ako bi se ekstraktanti primijenili direktno u bioreaktoru koji bi poslužio kao homogenizator faza, dolazilo bi do neminovnog dugotrajnog kontakta stanica radnog mikroorganizma i ekstraktanta. Zbog tog razloga je bilo bitno istražiti da li pojedini ekstraktant negativno djeluje na rast i preživljavanje stanica radnog mikroorganizma. U tu svrhu, testiran je svaki ekstraktant pojedinačno na način da je u podlogu s kvascem u eksponencijalnoj fazi rasta dodano organsko otapalo u količini od 3% i 10% vol/vol. Rezultati prikazani na slikama

4.22.-4.24. pokazuju da pentan-1-ol, oktan-1-ol i nonan-1-ol u tim koncentracijama toksično djeluju na stanice kvasca koje u prisustvu tih otapala nisu uopće rasle. U kontrolnom pokusu je naprotiv nakon određene lag faze zabilježen rast. Drugačiju situaciju je moguće vidjeti na slici 4.25. koja prikazuje djelovanje oleil alkohola na rast i preživljavanje radnog mikroorganizma. Tu je vidljivo da i oleil alkohol pokazuje inhibicijski učinak na rast stanica uporabljenog kvasca, ali je primjetan određeni rast stanica kako na koncentraciji 3% vol/vol tako na 10% vol/vol. Ovakvi rezultati (Slika 4.22.-4.25.) ukazuju da se pentan-1-ol, oktan-1-ol i nonan-1-ol ne bi mogli uporabiti kao ekstraktant direktno u samom bioreaktoru jer je njihov inhibicijski toksični učinak na radni mikroorganizam vrlo jak. U takvu svrhu bi se eventualno mogao uporabiti oleil alkohol, ali bi za konačni sud trebalo napraviti dodatne pokuse: testirati može li kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koristiti oleil alkohol kao jedini izvor ugljika i testiranje šireg koncentracijskog područja utjecaja oleil alkohola.

#### 4.4. ISTRAŽIVANJE EKSTRAKTIVNIH SVOJSTAVA EKSTRAKTANATA U KONTINUIRANOM SUSTAVU ZA EKSTRAKCIJU

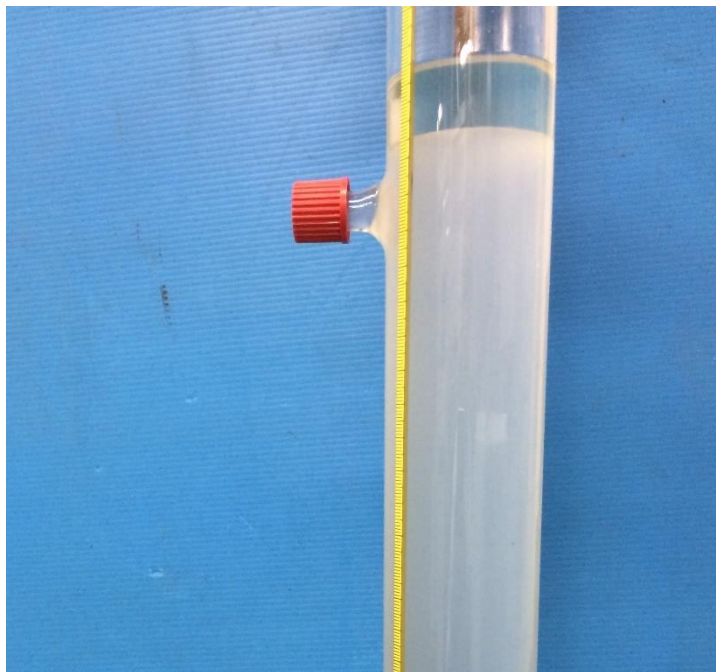
Reynoldsovi brojevi miješala u sekciji za miješanje ( $Re_i$ ) i Reynoldsovi brojevi za strujanje u sekciji za razdjeljivanje ( $Re$ ) prikazani su u tablici 4.5. Na slikama 4.26. – 4.29. prikazano je razdjeljivanje faza u sekciji za razdjeljivanje.

**Tablica 4.5.** Granični Reynoldsovi brojevi miješala za sustav podloga/organsko otapalo kod kojih dolazi do dobrog miješanja ekstraktanata s podlogom.

Otapalo	N ( $\text{o min}^{-1}$ )	$Re_i$	$Re$	Primjedba
pentan-1-ol	156	4514,04	2,16	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	180	5208,51	2,16	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	200	5787,23	2,16	Potpuno dispergirano otapalo u vodi
oktan-1-ol	150	3973,07	1,98	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	175	4635,25	1,98	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	187	4953,09	1,98	Potpuno dispergirano otapalo u vodi
nonan-1-ol	150	3759,20	1,87	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	218	5463,37	1,87	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	230	5764,11	1,87	Potpuno dispergirano otapalo u vodi
oleil alkohol	180	4116,09	1,71	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	193	4413,36	1,71	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	206	4710,64	1,71	Potpuno dispergirano otapalo u vodi

Slike 4.26. - 4.29. prikazuju razdvajanje faza dobiveno u kontinuiranom postupku u aparaturi (opis u točki 3.1.3.2.) kad je kao ekstraktant upotrijebljen pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol ili oleil alkohol.

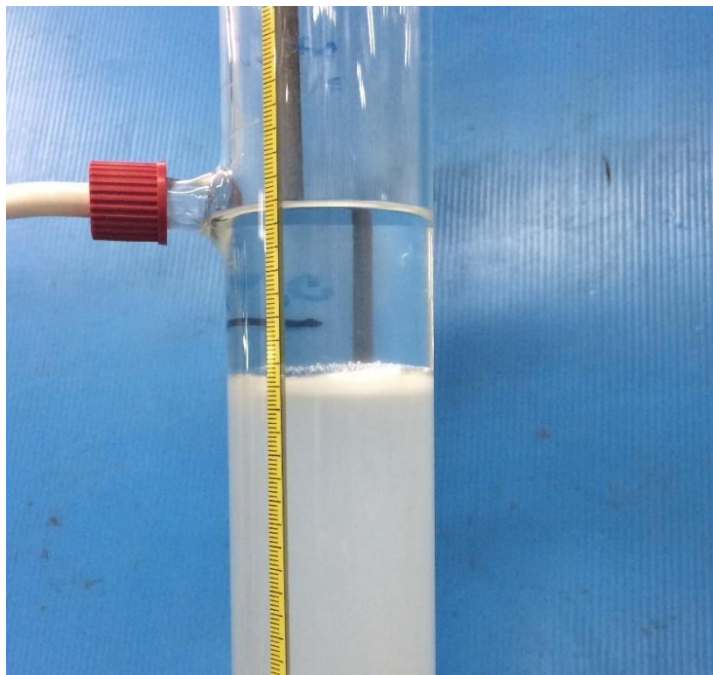




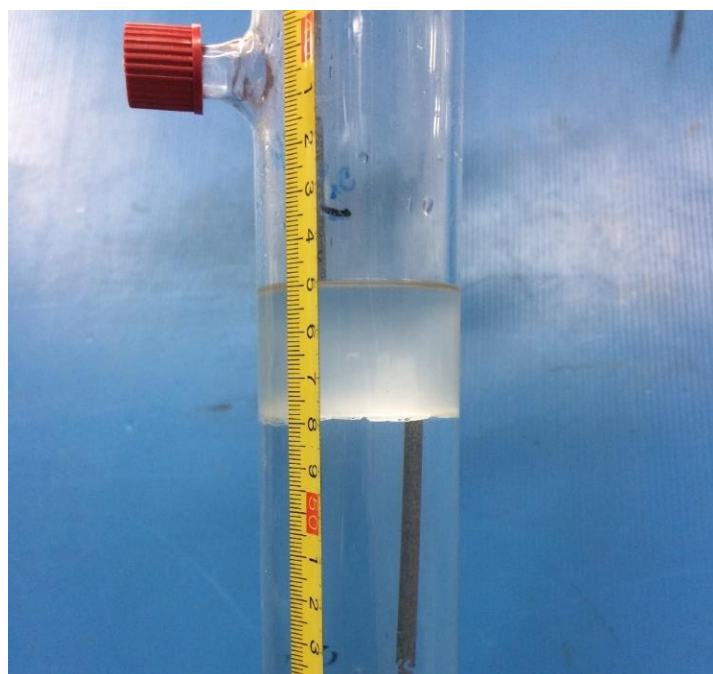
**Slika 4.26.** Razdvajanje faza u koloni za razdjeljivanje za ekstraktant pentan-1-ol. Primijenjen protok kroz kolonu iznosio je 2,04 L/h, srednja linearna brzina strujanja  $2,88 \cdot 10^4$  m/h, Re-broj strujanja kolone 2,16, primijenjen Re-broj miješala 5787,23.



**Slika 4.27.** Razdvajanje faza u koloni za razdjeljivanje za ekstraktant oktan-1-ol. Primijenjen protok kroz kolonu iznosio je 0,98 L/h, srednja linearna brzina strujanja  $1,51 \cdot 10^4$  m/h, Re-broj strujanja kolone 1,98, primijenjen Re-broj miješala 4953,09.



**Slika 4.28.** Razdvajanje faza u koloni za razdjeljivanje za ekstraktant nonan-1-ol. Primijenjen protok kroz kolonu iznosio je 0,98 L/h, srednja linearna brzina strujanja  $1,51 \cdot 10^4$  m/h, Re-broj strujanja kolone 1,87, primijenjen Re-broj miješala 5764,11.



**Slika 4.29.** Razdvajanje faza u koloni za razdjeljivanje za ekstraktant oleil alkohol. Primijenjen protok kroz kolonu iznosio je 0,98 L/h, srednja linearna brzina strujanja  $1,51 \cdot 10^4$  m/h, Re-broj strujanja kolone 1,71, primijenjen Re-broj miješala 4710,64.

Budući da su u preliminarnim testiranjima u epruветama svi sustavi (pojedino otapalo/voda/etanol) pokazali da u mirovanju razdvajaju slojeve organske i vodene faze (točka 4.1.3.) bilo je nužno provjeriti kako bi to razdvajanje funkcioniralo u kontinuiranom sustavu za razdjeljivanje faza. Ta provjera je bila potrebna tim više što je kod nekih sustava u određenim koncentracijskim omjerima primijećena manja ili veća pojava sloja emulzije koji se teško razdjeljivao na dvije faze. U tu svrhu iskorišten je uređaj prikazan na slici 3.2. koji je poslužio i za određivanje minimalnog potrebnog Reynoldsovog broja miješala za dobro dispergiranje ekstraktanta u podlozi u sekciji za miješanje. Rezultati prikazani u tablici 4.5 pokazuju da različita otapala imaju različiti odnos prema vodenoj fazi u pogledu potrebne mehaničke sile da bi se dobila potrebna razdjelna površina za prijenos mase i potreban stupanj disperzije organske u vodenoj fazi. Pentan-1-ol i nonan-1-ol su se dobro dispergirali u vodenoj fazi u sekciji za miješanje uz Reynoldsov broj miješala reda veličine 5800 (točnije 5787 za pentan-1-ol i 5764 za nonan-1-ol). Nasuprot tome oktan-1-ol i oleil alkohol su trebali nešto manje Reynoldsove brojeve miješala (4953 za oktan-1-ol i 4710 za oleil alkohol).

Razdvajanje faza u sekcijama za razdjeljivanje prikazano je na slikama 4.26.-4.29. U svim pokusima se pokazalo da primijenjeni Reynoldsov broj strujanja (Tablica 4.5.) u vertikalnim kolonama za razdjeljivanje omogućavaju da se svi ekstrakti dobro izdvoje na površinu vodene faze. Pri tome treba spomenuti da otapala pentan-1-ol i nonan-1-ol između čiste organske faze (ekstrakta) i rafinata stvaraju relativno visoki sloj emulzije (Slika 4.26. i 4.28.). Nasuprot tome, oleil alkohol je u koloni za razdjeljivanje uvijek stvarao relativno čisti sloj rafinata i vrlo slabu emulziju u ekstraktu (Slika 4.29.), dok je oktan-1-ol u koloni za razdjeljivanje stvarao čisti sloj rafinata i ekstrakta (Slika 4.27.). Ti rezultati upućuju na to da bi se primjenom odgovarajuće brzine strujanja u vertikalnim kolonama za razdjeljivanje moglo postići dobro razdvajanje ekstrakta od rafinata pri čemu bi se ekstrakt odvodio s vrha kolone, a rafinat s dna kolone. Otapala pentan-1-ol i nonan-1-ol bi u tom slučaju vrlo vjerojatno trebala dužu centralnu sekciju kolone da bi se nastale emulzije mogle uspješno razdvojiti na ekstrakt i rafinat.

Nakon ekstrakcije etanola u sustavu opisanom u točki 3.1.3.2. dobivene su frakcije koje su analizirane plinskom kromatografijom (opis u točki 3.1.3.1.). Tablica 4.6. prikazuje rezultate analize organske i vodene faze.

**Tablica 4.6.** Sastav rafinata i ekstrakta dobivenih u uređaju za istraživanje ekstrakcije.

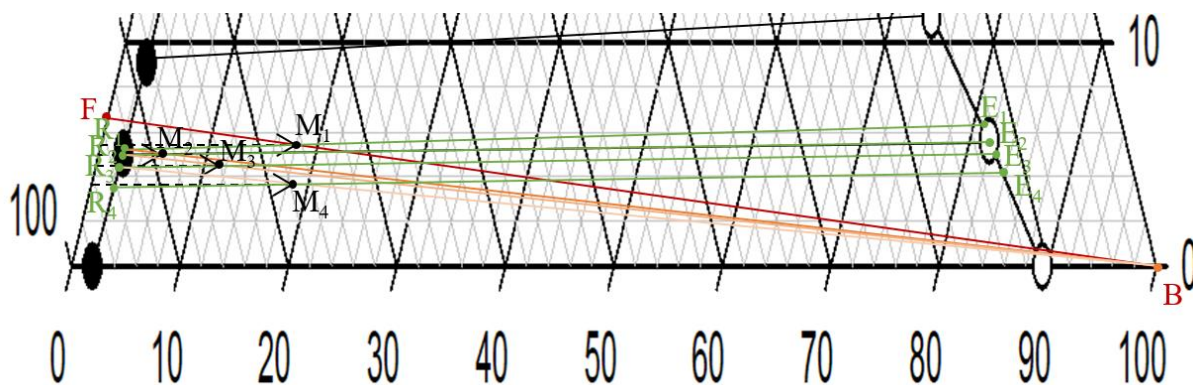
Otapalo	$\varphi_{\text{etanol}}$ (% vol/vol)	
	ekstrakt	Rafinat
pentan-1-ol	5,91	7,57
oktan-1-ol	4,71	4,80
nonan-1-ol	4,08	6,53
oleil alkohol	0,34	7,00

Rezultati pokazuju da je u frakciji s pentan-1-olom postignut najviši volumni udio etanola u ekstraktu, a najniži s oleil alkoholom. Zadovoljavajući sastav rafinata postignut je s oktan-1-olom kao ekstraktantom. Za ostala otapala trebali bi se provesti dodatni stupnjevi ekstrakcije kako bi se postigla željena koncentracija etanola u rafinatu ( $w_{\text{EtOH}} = 4\%$ ).

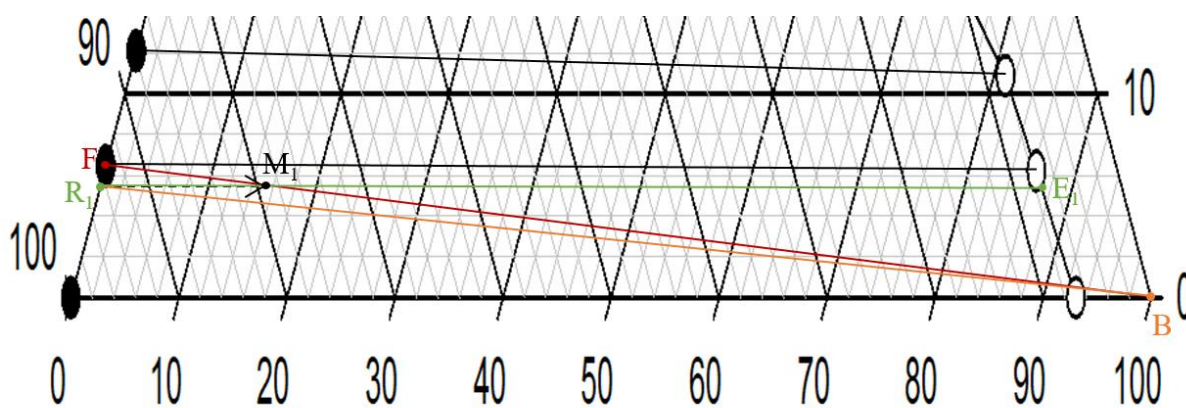
#### 4.5. ODREĐIVANJE BROJA POTREBNIH STUPNJEVA EKSTRAKCIJE ETANOLA

##### 4.5.1. Izračun broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za šaržnu ekstrakciju

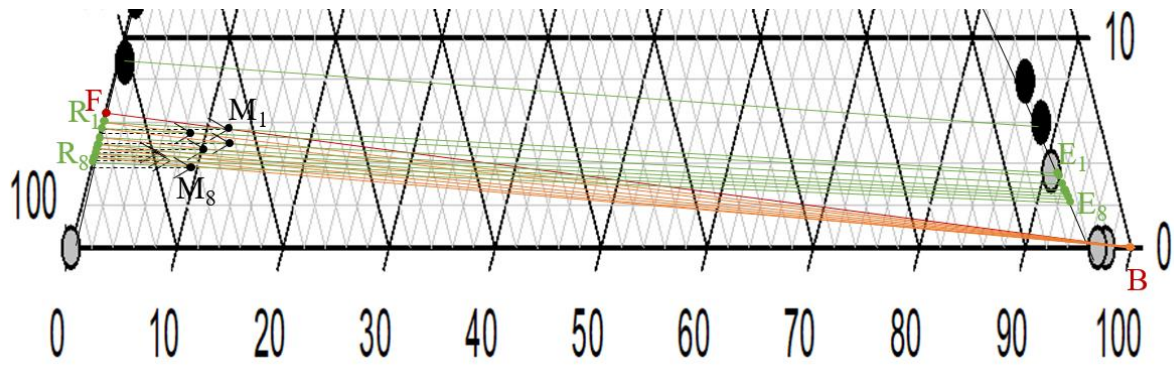
Na slikama 4.30. – 4.33. su prikazani rezultati grafičkog određivanja potrebnog broja teoretskih stupnjeva za šaržnu ekstrakciju etanola pentan-1-olom, oktan-1-olom, nonan-1-olom i oleil alkoholom. Tablica 4.7. prikazuje izračun potrebne količine otapala i broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju etanola istraživanim otapalima.



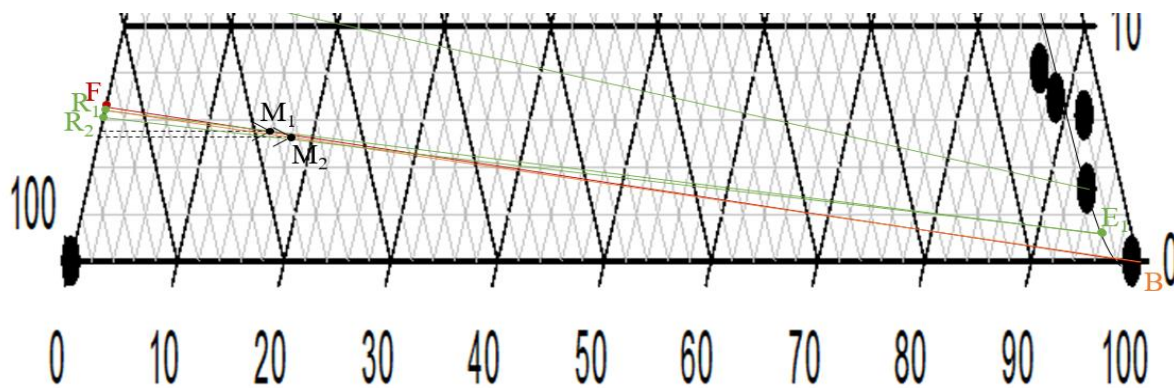
**Slika 4.30.** Grafičko određivanje broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju vodene otopine etanola s ekstraktantom pentan-1-olom.



**Slika 4.31.** Grafičko određivanje broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju vodene otopine etanola s ekstraktantom oktan-1-olom.



**Slika 4.32.** Grafičko određivanje broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju vodene otopine etanola s ekstraktantom nonan-1-olom.



**Slika 4.33.** Grafičko određivanje broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju vodene otopine etanola s ekstraktantom oleil alkoholom.

**Tablica 4.7.** Izračun potrebne količine otapala i broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju primjenom binodalnih dijagrama za pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol.

Otapalo za ekstrakciju	I. stupanj		II. stupanj		III. stupanj		... VIII. stupanj		$\sum m_B$ (kg)	$\sum m_{EiOH/E}$ (kg)	U (%)
	$m_{EiOH/E1}$ (kg)	$m_{EiOH/R1}$ (kg)	$m_{EiOH/E2}$ (kg)	$m_{EiOH/R2}$ (kg)	$m_{EiOH/E3}$ (kg)	$m_{EiOH/R3}$ (kg)	$m_{EiOH/E8}$ (kg)	$m_{EiOH/R8}$ (kg)			
Pentan-1-ol	15,91	47,23	9,52	37,74	17,75	19,97	-	-	300	47,47	75,21
Nonan-1-ol	4,32	58,80	1,05	57,70	2,81	54,89	2,02	43,60	800	19,45**	30,81
Oleil alkohol	0,97	62,17	0,99	61,20	-	-	-	-	200	1,96	3,11
Oktan-1-ol	nije određeno (nije moguće dobiti ekstrakt s višom koncentracijom etanola nego što je u mješavini)										

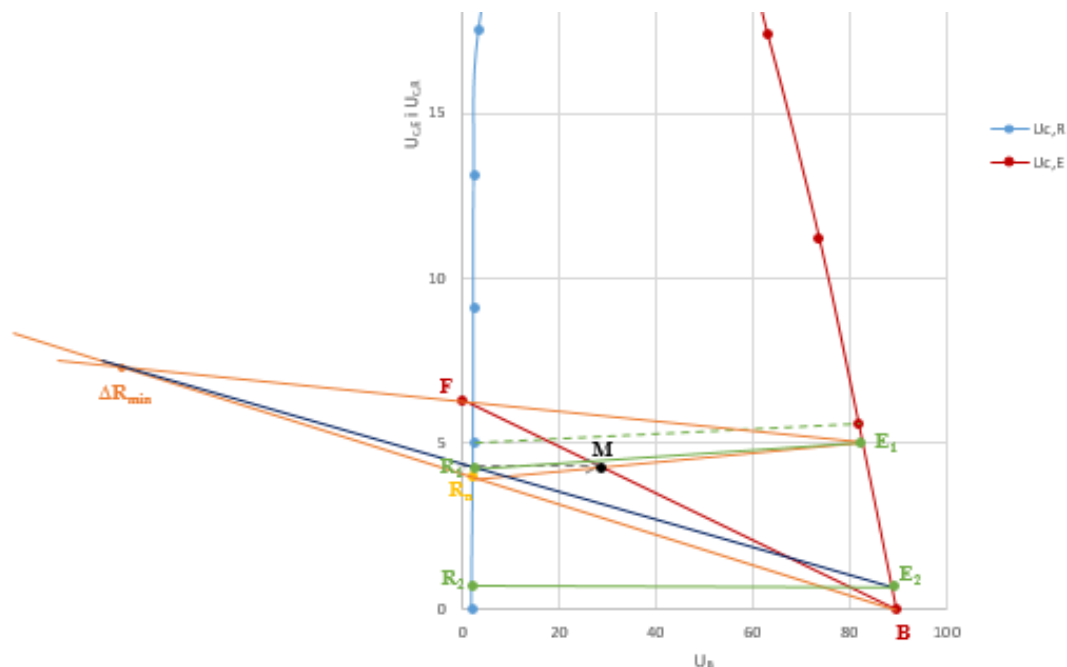
\*Početna masa podloge za sva otapala iznosila je 1000 kg, a masa etanola 63,12 kg. Za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju u svakom stupnju korišteno je 100 kg čistog otapala.

\*\*Za ekstrahiranje etanola do zadanog  $R_n$  (>4 % tež/tež) potrebno je osam stupnjeva ekstrakcije.

Ako bi se za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju kao ekstraktant koristio pentan-1-ol, ekstrakcija bi se mogla izvesti u tri stupnja da se dobije željena količina etanola u rafinatu ( $> 4\%$  tež/tež). Za oktan-1-ol nije bilo moguće odrediti potreban broj stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju da bi se dobila takva koncentracija etanola u rafinatu.. Uporabom oktan-1-ola se tijekom prvog stupnja ekstrakcije grafički dobila jednaka količina etanola u ekstraktu i rafinatu što znači da je koeficijent razdjeljenja jednak 1. Nonan-1-ol i oleil alkohol pokazuju nešto bolju sposobnost izdvajanja etanola u odnosu na oktan-1-ol, ali je za oleil alkohol grafički bilo nemoguće odrediti konačnu količinu otapala da se dobije  $4\%$  tež/tež etanola u rafinatu jer točke ekstrakta iz prvog i drugog stupnja padaju u istu točku zbog nagiba ravnotežnih linija. Ako bi se za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju kao ekstraktant koristio nonan-1-ol, ekstrakcija bi se mogla izvesti u osam stupnjeva da se dobije  $4\%$  tež/tež etanola u rafinatu.

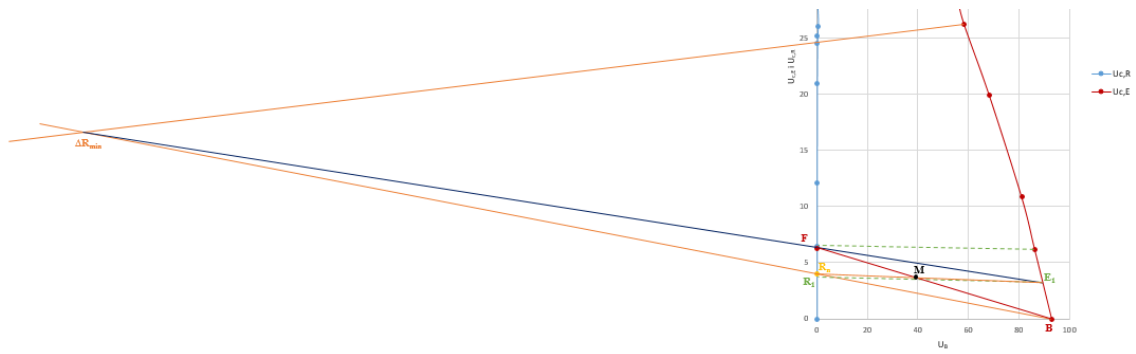
#### 4.5.2. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju

Na slikama 4.34. – 4.37. prikazano je grafičko određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju s pojedinim otapalima.

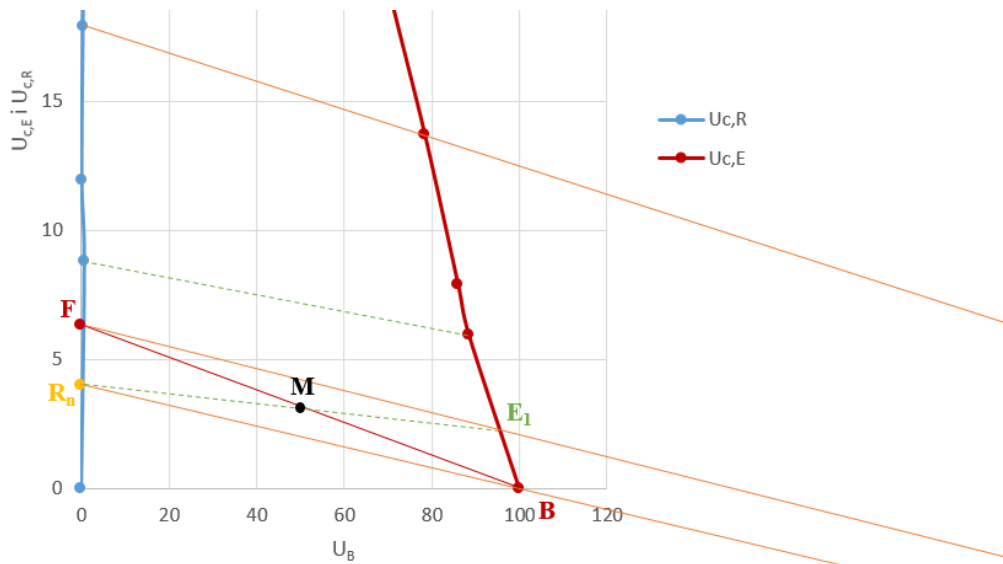


**Slika 4.34.** Grafičko određivanje potrebnog broja stupnjeva za kontinuiranu ekstrakciju etanola pentan-1-olom.

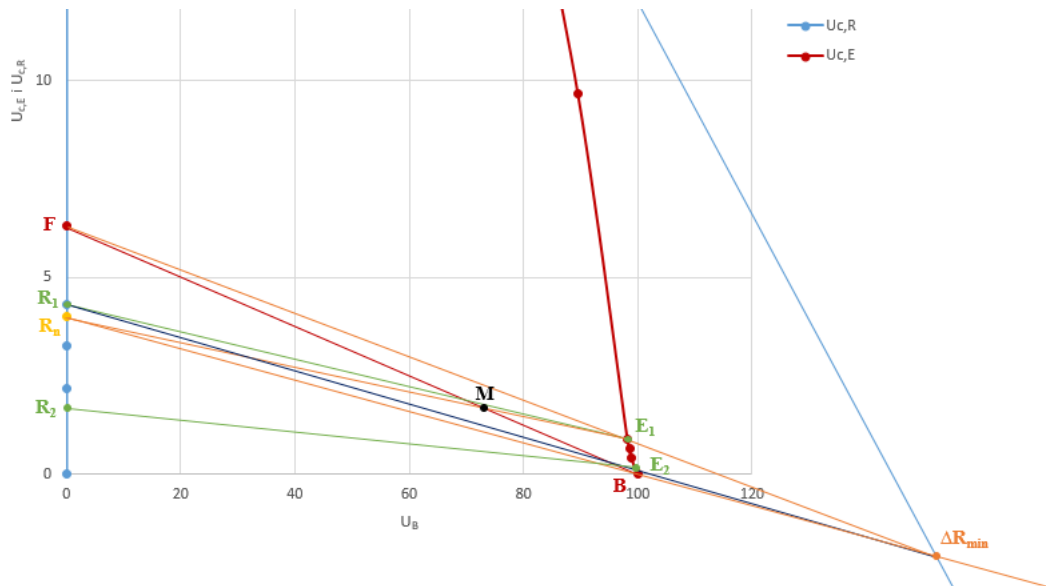




**Slika 4.35.** Grafičko određivanje potrebnog broja stupnjeva za kontinuiranu ekstrakciju etanola oktan-1-olom.

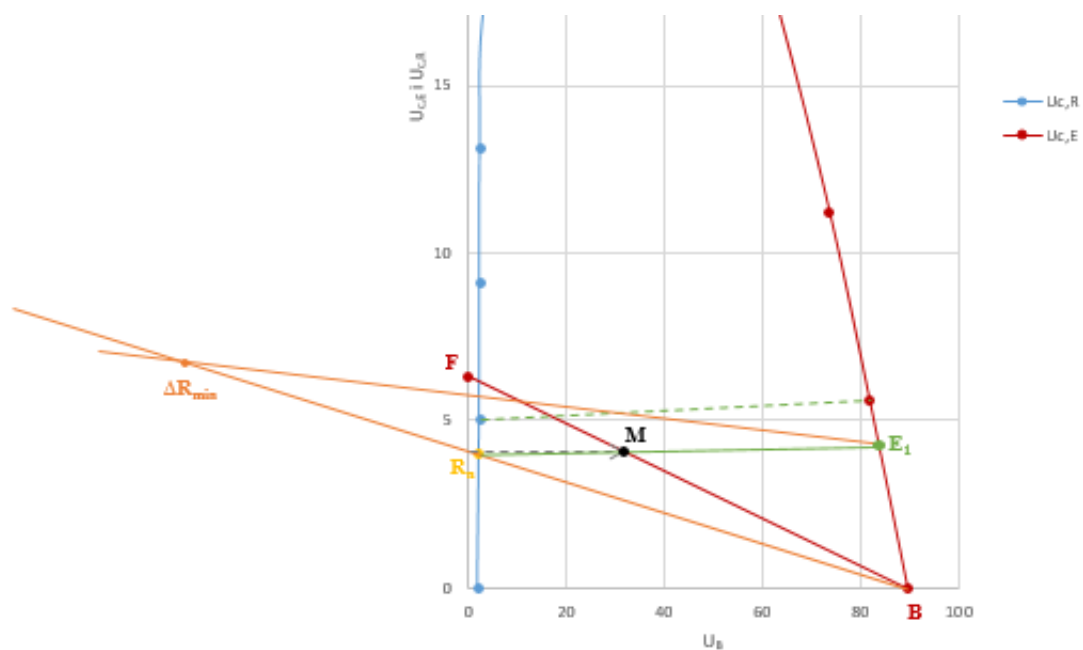


**Slika 4.36.** Grafičko određivanje potrebnog broja stupnjeva za kontinuiranu ekstrakciju etanola nonan-1-olom.

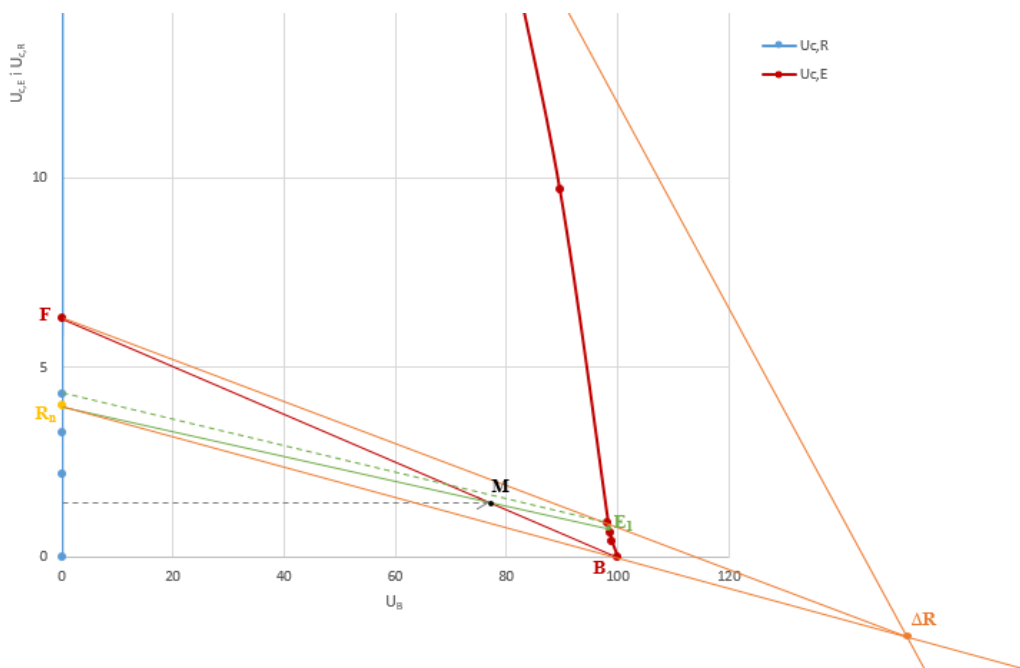


**Slika 4.37.** Grafičko određivanje potrebnog broja stupnjeva za kontinuiranu ekstrakciju etanola oleil alkoholom.

Na slikama 4.38. i 4.39. prikazano je grafičko određivanje potrebnog protoka za jednostupanjsku ekstrakciju etanola s pentan-1-olom i oleil alkoholom.



**Slika 4.38.** Grafičko određivanje potrebnog protoka ekstraktanta za jednostupanjsku ekstrakciju etanola pentan-1-olom.



**Slika 4.39.** Grafičko određivanje potrebnog protoka ekstraktanta za jednostupanjsku ekstrakciju etanola oleil alkoholom.

Rezultati grafičkog određivanja minimalnog protoka ekstraktanta u protustrujnoj kontinuiranoj ekstrakciji  $(F_{m,B})_{\min}$  i dobiveni udjeli etanola u ekstraktu i rafinatu prikazani su u tablici 4.8.

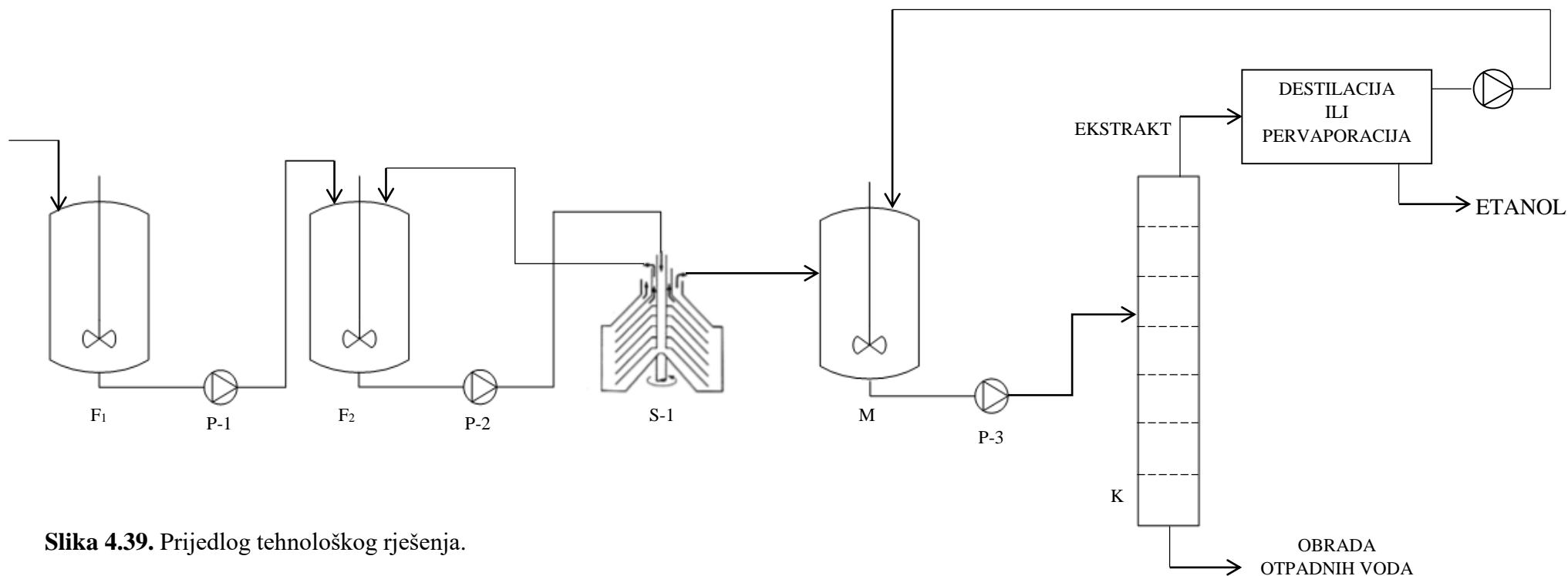
**Tablica 4.8.** Rezultati grafičkog određivanja količine ekstraktanta.

Otopalo za ekstrakciju	$(F_{m,B})_{\min}$ (kg/h)	I. stupanj		II. stupanj	
		$U_{EtOH/E1}$ (%)	$U_{EtOH/R1}$ (%)	$U_{EtOH/E2}$ (%)	$U_{EtOH/R2}$ (%)
pentan-1-ol	450	5,1	4,3	1,0	0,7
pentan-1-ol	528	4,2	4,0	-	-
oktan-1-ol	824	3,0	3,5	-	-
nonan-1-ol	1000	2,2	4,0	-	-
oleil alkohol	2655	0,9	4,3	0,2	1,7
oleil alkohol	3400	0,8	4,0	-	-

Rezultati prikazani u tablici 4.8. dobiveni su po pretpostavkom da u uređaj za ekstrakciju ulazi 1000 kg/h fermentirane podloge koja sadrži 6,3 % tež/tež etanola s ciljem da se dobije koncentracija u rafinatu 4% tež/tež. Oni pokazuju kako je s pentan-1-olom kao

ekstraktantom moguće postići željeni sastav etanola u rafinatu s najmanjim protokom (količinom) otapala u odnosu na ostale ekstraktante. Ipak, ako bi se ekstrakcija provodila u jednom stupnju, potreban protok otapala bi trebao biti nešto viši od protoka otapala potrebnog za svaki pojedini stupanj od onog ako se ekstrakcija vrši u više stupnjeva. Oktan-1-ol i nonan-1-ol su pokazali da je za isti ulazni protok podloge potreban veći protok otapala (nego kad je primijenjen pentan-1-ol), a da bi se u jednom stupnju postigla željena koncentracija etanola u rafinatu. S oleil alkoholom kao ekstraktantom je postignut željeni udio etanola u rafinatu uz daleko veći ulazni protokom otapala (2655 kg/h) nego je to slučaj za sve ostale ekstraktante. To je razočaravajući rezultat, jer bi se od svih istraživanih otapala oleil alkohol najlakše proizveo iz obnovljivih izvora (redukcijom karboksilne grupe oleinske kiseline koja je sastavnica mnogih biljnih ulja i životinjskih masti). Obzirom na potrebne količine ekstraktanata (Tablica 4.8), jedino bi uporaba pentan-1-ola postigla željeni cilj: smanjenje mase koja bi se podvrgnula destilaciji i tome adekvatna ušteda na toplinskoj energiji (528 kg/h otapala + 22,17 kg/h etanola = 550,17 kg/h ekstrakta prema 1000 kg/h fermentirane podloge).

## 4.6. PRIJEDLOG TEHNOLOŠKOG RJEŠENJA



**Slika 4.39.** Prijedlog tehnološkog rješenja.

F<sub>1</sub> = fermentiranje pentoza, F<sub>2</sub> = fermentiranje heksoza, S-1 = separacija kvasca

M = posuda za miješanje otapala i podloge, K = kolona za razdjeljivanje ekstrakt/rafinat

P-1, P-2, P-3 = pumpa

\* M, posuda za miješanje i K, kolona za razdjeljivanje mogli bi se zamijeniti kontinuiranim centrifugalnim ekstraktorom

Predloženo tehnološko rješenje pretpostavlja da se za fermentiranje koriste mikroorganizmi koji nisu genetički modificirani (u smislu sposobnosti istovremene fermentacije pentozna i heksoza). To je i razlog zašto je predložena dvostupanjska fermentacija. Alternativa tom dijelu tehnološkog postrojenja jest istovremena kombinirana fermentacija s dva radna mikroorganizma (jedan za pentoze i jedan za heksoze) u jednom stupnju, ili uporaba genetički modificiranog organizma koji može fermentirati pentoze i heksoze. Zbog toksičnog djelovanja otapala na proizvodni *Saccharomyces cerevisiae*, u tehnološku liniju je postavljen centrifugalni separator uz reciklaciju biomase, s ciljem da se stanice kvasca izdvoje prije kontakta s otapalom i izbjegne toksični učinak. Ekstraktivni dio postrojenja mogao bi biti izveden kao kontinuirana ekstrakcija kolonskog tipa ili kao centrifugalni ekstraktor. U slučaju primjene ovog posljednjeg, postoji mogućnost izostavljanja separatora za kvasac, jer bi zbog kratkotrajnosti kontakta podloge i ekstraktanta u takvom uređaju toksični učinak otapala bio smanjen, centrifugalna sila bi mogla biti uporabljena za istovremeno razdvajanje ekstrakta od rafinata i stanica mikroorganizma od otapala (očekuje se da stanice budu izdvojene s težom, vodenom fazom). No, takva konfiguracija bi trebala obvezno biti provjerena dodatnim eksperimentima u smislu istraživanja toksičnosti otapala na stanice u uvjetima kratkotrajnih kontakata s otapalom.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primijenjeni ekstraktanti (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol) u smjesi s etanolom i vodom pokazuju sposobnost razdvajanja na dvije faze, ekstrakt i rafinat što ih čini pogodnima za ekstrakciju fermentiranih podloga koje sadrže etanol.
2. Pentan-1-ol, oktan-1-ol i nonan-1-ol u koncentraciji od 3% vol/vol i 10% vol/vol pokazuju toksični učinak na stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, dok oleil alkohol u istoj količini pokazuje inhibicijski učinak, uz primijećen rast stanica. Takav rezultat upućuje na to da bi se stanice kvasca trebalo izdvojiti iz podloge prije ekstrakcije, odnosno u slučaju primjene kontinuiranih ekstraktora s kratkotrajnim kontaktom ekstraktanta i podloge bilo bi potrebno spriječiti vraćanje ekstraktanta u bioreaktor.
3. U šaržnoj ekstrakciji etanola (s ciljem da se postigne konačna koncentracija etanola u završnom rafinatu 0,04 kg/kg uz maseni odnos ishodišne otopine odnosno pojedinog rafinata i ekstraktanta A:B), bila bi za pentan-1-ol potrebna tri stupnja ekstrakcije (postignuta učinkovitost 75,21%), za nonan-1-ol osam stupnjeva ekstrakcije (postignuta učinkovitost 30,81%), a za oleil alkohol jedan stupanj (učinkovitosti 3,11%). Zbog oblika binodalnog dijagrama za ovaj ekstraktant nije bilo moguće grafički odrediti koncentracije etanola u rafinatu i ekstraktu za drugi, treći i više stupnjeve ekstrakcije. Broj potrebnih stupnjeva za šaržnu ekstrakciju etanola oktan-1-olom se također nije mogao grafički odrediti u području zadane konačne koncentracije etanola zbog položaja spojnice krajnjih točaka binodalne krivulje na trokutnom koncentracijskom dijagramu.
4. Kontinuirana ekstrakcija etanola bi se mogla provesti sa svim istraživanim otapalima s ciljem da se u rafinatu dobije 0,04 kg/kg etanola. Za ulazni tok podloge u ekstraktor od 1000 kg/h koncentracije 0,063 kg/kg etanola, najmanji protok otapala 450 kg/h bio bi potreban za pentan-1-ol, te 824 kg/h za oktan-1-ol, 1000 kg/h za nonan-1-ol i 2655 kg/h za oleil alkohol.

## 6. LITERATURA

Aichholz, R., Spitzer, V., Lorbeer, E. (1998). High Temperature Gas Chromatography and High Temperature Gas Chromatography– Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry of Derivatized Triglycerides Containing Oxygenated Fatty Acid Acyl Groups. *J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 152–160.

Arce, A., Blanco, A., Souza, P., Vidal, I. (1994) Liquid-Liquid Equilibria of Water + Methanol + 1-Octanol and Water + Ethanol + 1-Octanol at Various Temperatures. *J. Chem. Eng. Data.* **39**, 378-380.

Boudreau, T. M., Hill, G.A. (2006) Improved ethanol–water separation using fatty acids, *Process Biochem.* **41**, 980–983.

Cabral, J. M. S. (1991) Extractive removal of product by biocatalysis, U: Extractive Bioconversions (Mattiasson, B., Holst, O., ured.), , Marcell Dekker, Inc., NewYork, 207–235.

Cho, T., Shuler, M. L. (1986) Multimembrane bioreactor for extractive fermentation, *Biotechnol. Prog.* **2**, 53–60.

Dadgar, A. M., Foutch, G. L. (1985) Evaluation of solvents for the recovery of *Clostridium* fermentation products by liquid-liquid extraction. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **15**:611–620. Gatlinburg, TN, USA, John Wiley & Sons.

Daugulis, A. J. (1988) Integrated reaction and product recovery in bioreactor system. *Biotechnol. Prog.* **4**, 113–122.

Daugulis, A. J., Axford, D. B., Ciszek, B., Malinowski, J. J. (1994) Continuous fermentation of high-strength glucose feeds to ethanol. *Biotechnol. Lett.* **16**, 637–642.

Frolkova, A. K.; Raeva, V. M. (2009) Bioethanol Dehydration: State of the Art. *Khimicheskaya Tekhnologiya.* **10**, 8:469–482.

Honda, H., Taya, M., Kobayashi, T. (1986) Ethanol fermentation associated with solvent extraction using immobilized growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* and its lactose-fermentable fusant, *J. Chem. Eng. Jpn.* **19**, 268–273.

Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, W., Ramarao, B.V. (2008) A Review of Separation Technologies in Current and Future Biorefineries, *Sep. Purif. Technol.*, **62**, 1–21.



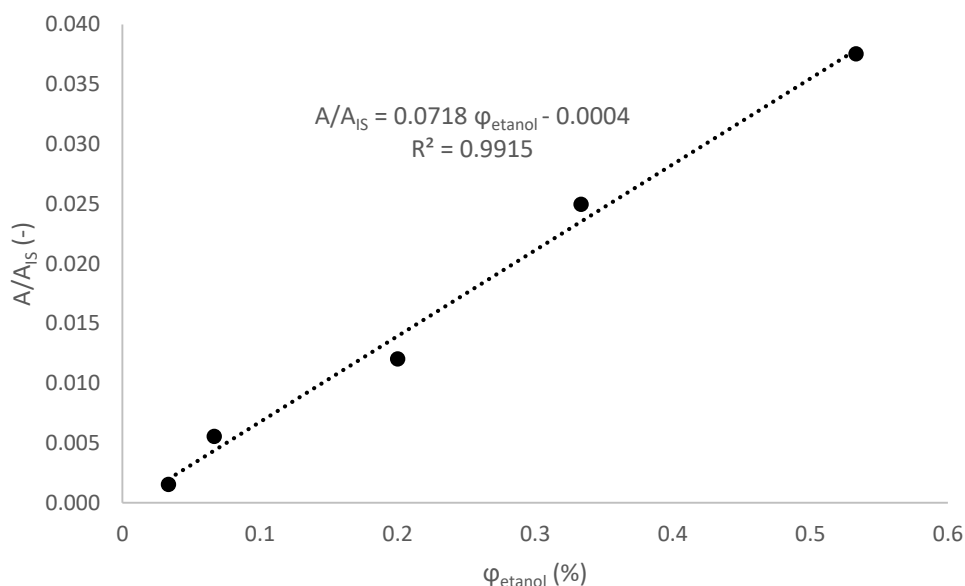
- Kirbaslar, I., Cehreli, S., Ustun, D., Keskinocak, E. (2000) Equilibrium data on ethanol-water-solvent ternaries. *Braz. J. Chem. Eng.* **17**, 1-8.
- Kötter, P., Ciriacy, (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 776-783.
- Ladisch, M. R. and Svarczkopf, J. A. (1991) Ethanol production and the cost of fermentable sugars from biomass. *Bioresour. Technol.* **36**, 83-95.
- Lynd, L. R. (1990) Large-scale fuel ethanol from lignocellulose; Potential, economics, and research priorities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 695-719.
- McMillan, J.D. (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. U: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, (Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., ured.), American Chemical Society, Washington, DC, str. 292–324.
- Mehta, G. D., Fraser, M. D. (1985) A Novel Extraction Process for Separating Ethanol and Water Ind. *Eng. Chem. Process Des. Dev.* **24**, 556-560.
- Meinander, N., Hallborn, J., Keränen, S., Ojamo, H., Penttilä, M., Walfridsson, M., Hahn-Hägerdal, B. (1994). Utilization of xylose with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring genes for xylose metabolism from *Pichia stipitis*. ECB6: Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology, Elsevier Science, B.V. Amsterdam, 1143-1146.
- Minier, M., Goma, G. (1982) Ethanol production by extractive fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 1565–1579.
- Munson, C. L., King, C. J. (1984) Factors influencing solvent selection for extraction of ethanol from aqueous solutions. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **23**, 109–115.
- Murphy, T.K., Blanch, H.W., Wilke, C.R. (1982) Water recycling in extractive fermentation, *Process Biochem.* **17**, 6–9, 40.
- Nguyen, Q.A. and Saddler, J.N. (1991) An integrated model for the technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process. *Bioresour. Technol.* **35**, 275-282.
- Offeman, R. D., Franqui-Espiet, D., Cline, J. L., Robertson, G. H., Orts, W. J. (2010) Extraction of ethanol with higher carboxylic acid solvents and their toxicity to yeast. *Sep. Purif. Technol.* **72**, 180-185.

- Offeman, R.D., Stephenson, S.K., Franqui, P., Cline, J.L. (2008) Extraction of Ethanol with Higher Alcohol Solvents and Their Toxicity to Yeast. *Sep. Purif. Technol.* **63**, 2:444–451.
- Offeman, R. D. Stephenson, S. K. Robertson, G. H., Orts, W. J. (2006) Solvent Extraction of Ethanol from Aqueous Solutions Using Biobased Oils, Alcohols, and Esters, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **83**, 2:153-157.
- Offeman, R. D., Stephenson, S. K., Robertson, G. H., Orts, W. J. (2005) Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions. I. Screening methodology for solvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**:6789–6796.
- Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1993) Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. *Prec. Biochem.* **28**, 249-257
- Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Tech.* 18:312-331.
- Onuki, S.; Koziel, J. A.; van Leeuwen, J.; Jenks, W. S.; Grewell, D. A.; Cai, L. (2008) Ethanol production, purification, and analysis techniques: a review. *Agricultural and Biosystems Engineering Conference Proceedings and Presentations.* 68. <[http://lib.dr.iastate.edu/abe\\_eng\\_conf/68](http://lib.dr.iastate.edu/abe_eng_conf/68)>. Pristupljeno 25.05.2017.
- Qureshi, N., Maddox, I. S., Friedl, A. (1992) Application of continuous substrate feeding to the ABE fermentation: relief of product inhibition using extraction, perstraction, stripping, and pervaporation. *Biotechnol. Prog.* **8**, 382–390.
- Rahman, M. A., Rahman, M. S., Nabi, M. N. (2001) Extraction of ethanol from aqueous solution by solvent extraction-liquid-liquid equilibrium of ethanol-water-1-butanol, ethanol-water-1-pentanol and ethanol-water-1-hexanol systems. *Indian. J. Chem. Techn.* **8**, 385-389.
- Rahman, M. A., Rahman, M. S., Asadullah, M. (1995) Production of Fuel Grade Ethanol from Dilute Solution by Liquid–Liquid Extraction Using Vegetable Oils as Solvents. *Indian J. Chem. Technol.* **2**, 90–92.
- Roddy, J. W. (1981) Distribution of ethanol–water mixtures to organic liquids. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **20**, 104–108.
- Seader, J. D., Henley, E. J. (2006) *Separation process principles*, 2. izd., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, str. 295-304.

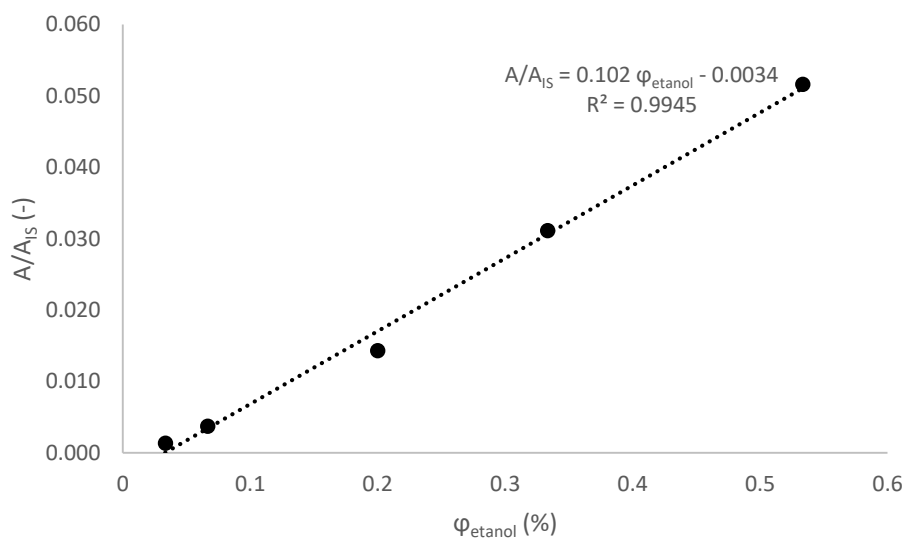
- Stang, G. D., Macdonald, D. G., Hill, G. A. (2001) Mass transfer and bioethanol production in an external loop liquid lift bioreactor. *Ind Eng Chem Res.* 40:5074–80.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.
- Swings, J., De Ley, J. (1977) The biology of *Zymomonas*. *Baeteriol. Rev.* **41**, 1-46.
- Tantirungkij, M., Nakashima, N., Seki, T., Yoshida, T. (1993) Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 83-88
- Vane, L. M. (2008) Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **108**;. 2:553–588.
- Wiegel, J., Ljungdahl, L. G. (1986) The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* **3**, 39-107
- Wright, J.D. (1988) Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chem. Eng. Proc.* **84**, 62-74.

## 7. PRILOZI

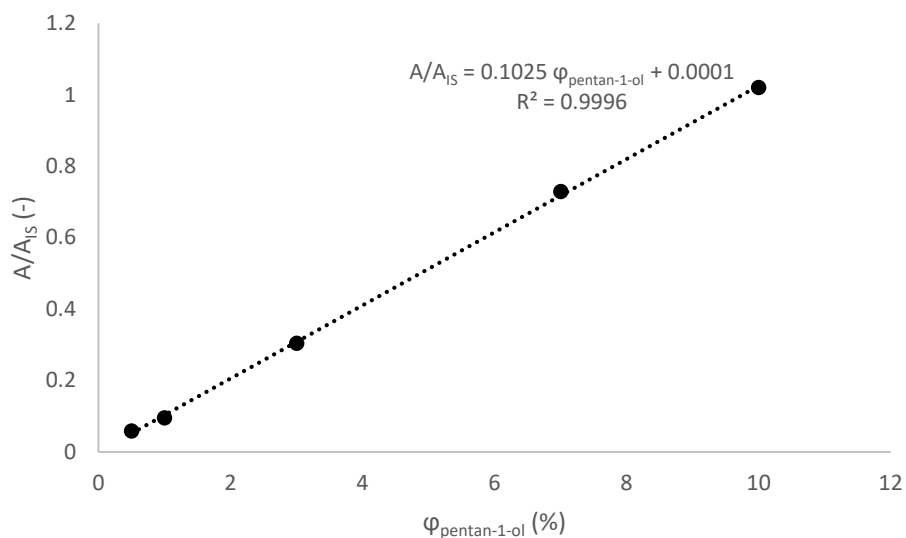
### 7.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE VOLUMNOG UDJELA ETANOLA I OTAPALA (PENTAN-1-OLA, OKTAN-1-OLA, NONAN-1-OLA I OLEIL ALKOHOLA)



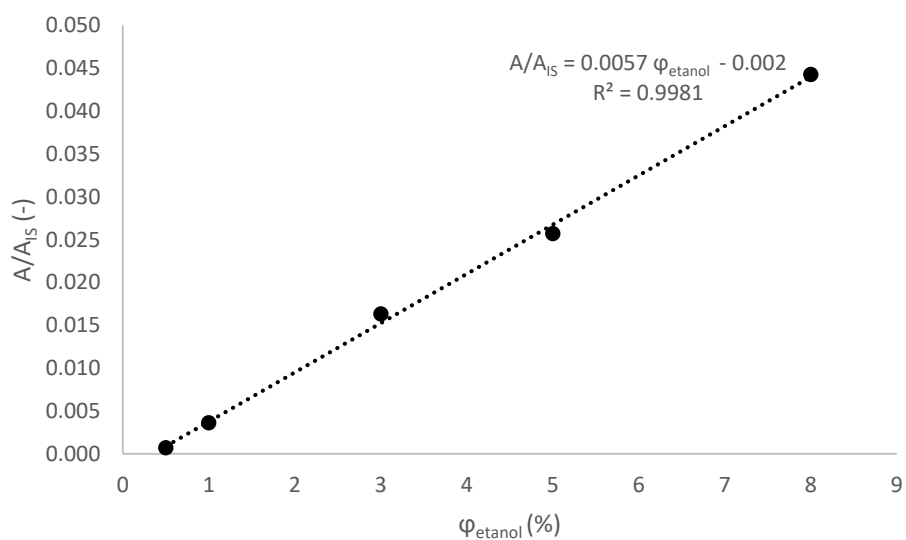
**Slika 7.1.** Baždarni dijagram za kromatografsko određivanje (GC) volumnog udjela etanola u vodenoj fazi.



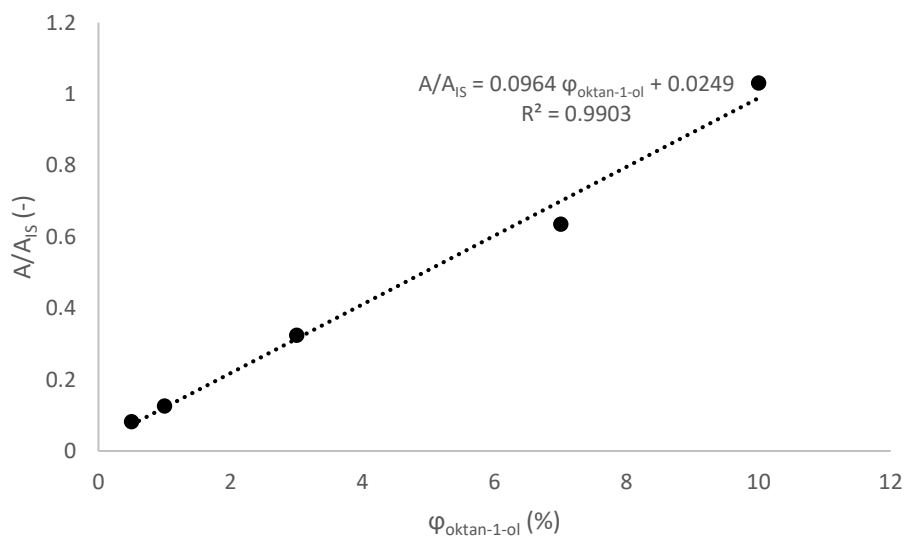
**Slika 7.2.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela etanola u smjesi etanol/pentan-1-ol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



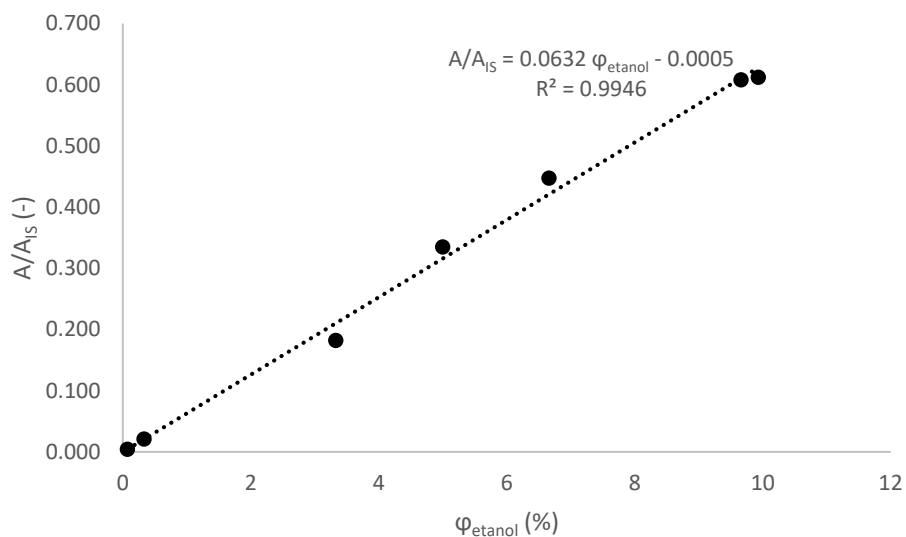
**Slika 7.3.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela pentan-1-ola u smjesi etanol/pentan-1-ol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



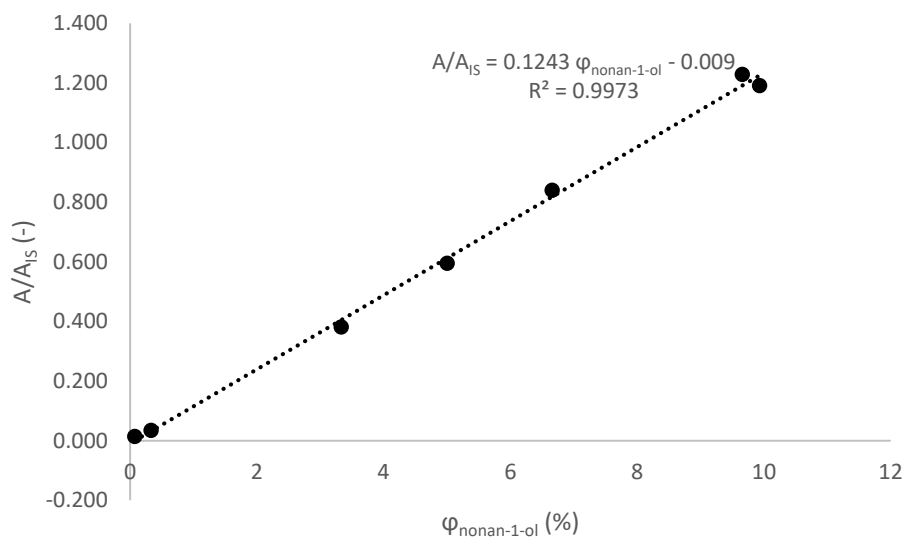
**Slika 7.4.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela etanola u smjesi etanol/oktan-1-ol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



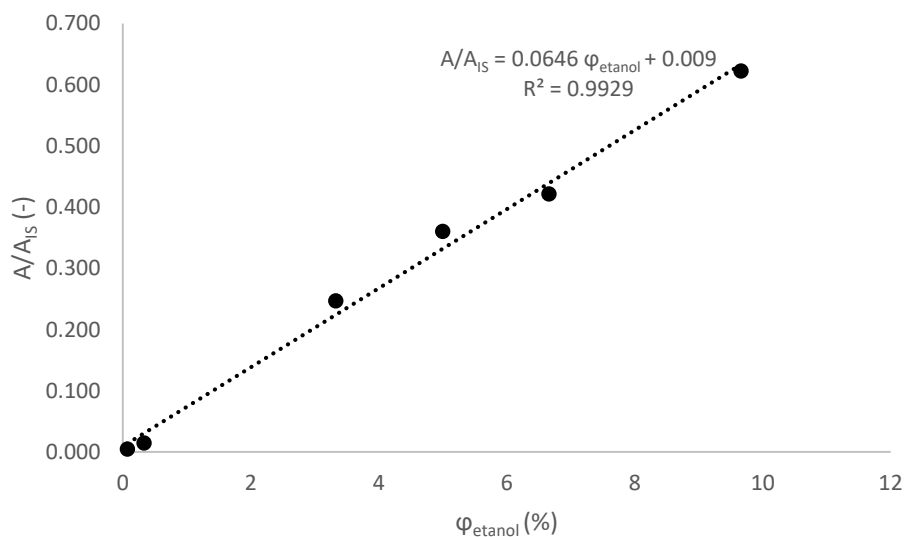
**Slika 7.5.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela oktan-1-ola u smjesi etanol/oktan-1-ol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



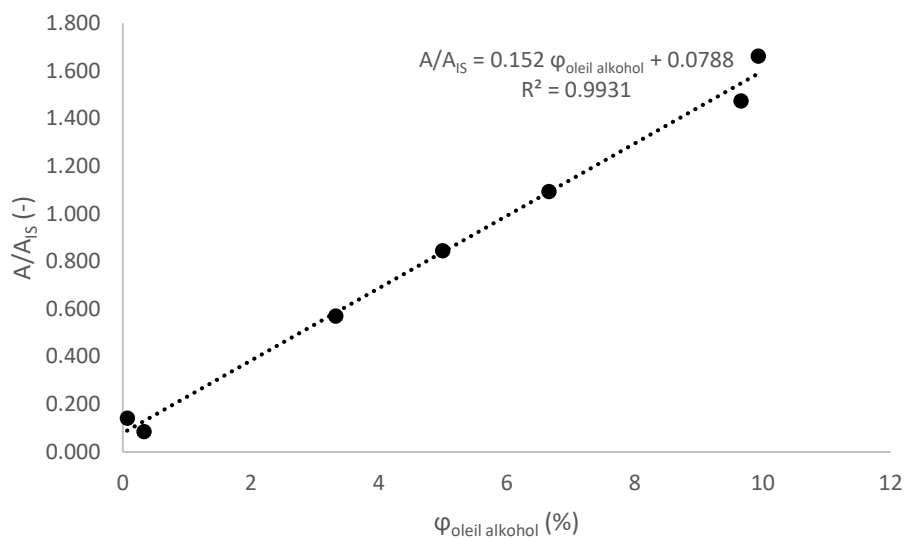
**Slika 7.6.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela etanola u smjesi etanol/nonan-1-ol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



**Slika 7.7.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela nonan-1-ola u smjesi etanol/nonan-1-ol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



**Slika 7.8.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela etanola u smjesi etanol/oleil alkohol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



**Slika 7.9.** Baždarni dijagram za kromatografsko (GC) određivanje volumnog udjela oleil alkohola u smjesi etanol/oleil alkohol/acetone uporabljen za mjerenje ravnotežnih koncentracija u organskoj fazi i formiranje binodalnog trokomponentnog dijagrama. Mobilna faza: helij.



## 7.2. POPIS KRATICA

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
$m_{\text{EtOH/E1}}$	masa etanola u ekstraktu prvog stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/R1}}$	masa etanola u rafinatu prvog stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/E2}}$	masa etanola u ekstraktu drugog stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/R2}}$	masa etanola u rafinatu drugog stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/E3}}$	masa etanola u ekstraktu trećeg stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/R3}}$	masa etanola u rafinatu trećeg stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/E8}}$	masa etanola u ekstraktu osmog stupnja	kg
$m_{\text{EtOH/R8}}$	masa etanola u rafinatu osmog stupnja	kg
$\sum m_B$	suma mase otapala	kg
$\sum m_{\text{EtOH/E}}$	suma mase etanola u ekstraktu	kg
$U$	uspješnost ekstrakcije	%
$(F_{m,B})_{\text{min}}$	minimalni protok otapala u kontinuiranoj ekstrakciji	kg/h
$U_{\text{EtOH/E1}}$	udio etanola u ekstraktu prvog stupnja kontinuirane ekstrakcije	
$U_{\text{EtOH/R1}}$	udio etanola u rafinatu prvog stupnja kontinuirane ekstrakcije	
$U_{\text{EtOH/E2}}$	udio etanola u ekstraktu drugog stupnja kontinuirane ekstrakcije	
$U_{\text{EtOH/R2}}$	udio etanola u rafinatu drugog stupnja kontinuirane ekstrakcije	