

# Proizvodnja bioetanola iz rogača

---

**Tišljar, Petra**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:571664>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Petra Tišljar**

**6874/PT**

**PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ ROGAČA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Proizvodnja jakih alkoholnih pića**

**Mentor: izv.prof.dr.sc. Damir Stanzer**

**Zagreb, 2018.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasaca

## PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ ROGAČA

Petra Tišljar, 0068218834

**Sažetak:** Glavni način za dobivanje energije je sagorijevanje fosilnih goriva što ima štetan učinak na okoliš. Stoga je potrebno pronaći nove i alternativne izvore energije. U ovom radu se prikazuje mogućnost proizvodnje bioetanol iz rogača alkoholnom fermentacijom. Uspoređuju se različiti tipovi fermentacija te učinak provođenja fermentacije pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i bakterije *Zymomonas mobilis*.

**Ključne riječi:** fermentacija, bioetanol, rogač, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*

**Rad sadrži:** 22 stranica, 7 slika

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Damir Stanzer, izv.prof.dr.sc.

**Pomoć pri izradi:** Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

**Datum obrane:** 20.09.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Fermentation and Yeast Technology**

### ETHANOL PRODUCTION FROM CAROB POD

**Petra Tišljar, 0068218834**

**Abstract:** Fossil fuels are the main source of energy, which has damaging effect on the environment and is not a renewable source of energy. Therefore, it is necessary to find new and alternative energy sources. This paper describes bioethanol production by alcohol fermentation of carob. Various types of fermentation with yeast *Saccharomyces cerevisiae* and bacteria *Zymomonas mobilis* are being compared.

**Keywords:** fermentation, bioethanol, carob pod, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*

**Thesis contains:** 22 pages, 7 pictures

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Damir Stanzer, dr. sc. ass. prof.

**Technical support and assistance:** Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

**Defence date:** 20.09.2018.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PROIZVODNJA BIOETANOLA .....	3
2.1. BIOETANOL.....	3
2.2. ALKOHOLNA FERMENTACIJA .....	4
2.3. PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ RAZLIČITIH SIROVINA .....	6
3. ROGAČ.....	8
4. PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ ROGAČA .....	10
4.1. PROIZVODNJA BIOETANOLA POMOĆU KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
4.2. PROIZVODNJA BIOETANOLA POMOĆU BAKTERIJE <i>Zymomonas mobilis</i> .....	16
5. ZAKLJUČCI.....	18
6. LITERATURA .....	19

## 1. UVOD

Danas se kao glavni izvor energije koriste fosilna goriva koja su nastala u Zemljinoj kori fosilizacijom biljaka i životinja pod utjecajem pritiska i topline tijekom milijuna godina. U skupinu fosilnih goriva ubrajaju se metan, nafta, zemni plin, itd. Osim što se izgaranjem fosilnih goriva oslobađa velika količina energije, oslobađaju se i štetni plinovi, kao što su ugljični monoksid, ugljični dioksid, metan, sumporov dioksid i još mnogi koji se nakupljaju u atmosferi. Nakupljanjem plinova u atmosferi dolazi do nastanka efekta staklenika. Dio plinova otapa se u vodi koja se nalazi u atmosferi što uzrokuje snižavanje njene pH - vrijednost i nastanak kiselih kiša koje oštećuju biljke i pospješuju eroziju tla te građevina. Zbog štetnog utjecaja na okoliš te nemogućnosti obnove izvora fosilnih goriva potrebno je istražiti nove i obnovljive izvore energije.

Obnovljivim izvorima energije smatraju se vjetar, Sunce, geotermalni izvori i biomasa. Prema direktivi EU i Vijeća Europe biomasa je definirana kao „biorazgradivi dijelovi proizvoda, otpada ili ostataka iz poljoprivrede, šumski otpad i otpad srodnih industrija kao i biorazgradivi dijelovi industrijskog i gradskog otpada“. Biomasi čine proizvodi biljnog i životinjskog svijeta, u to se ubrajaju neiskorišteni dijelovi šumarsko – drvne industrije, poljoprivredne proizvodnje, prehrambene industrije, komunalnog otpada organskog porijekla i sl. Glavna prednost korištenja biomase kao izvora energije su obilni potencijali, ne samo za tu namjenu uzgojenih biljnih vrsta, već i nusproizvoda i otpadnog materijala u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji. Prednost biomase u odnosu na fosilna goriva je i neusporedivo manja emisija štetnih plinova i otpadnih tvari. Smanjenje izvora, porast cijene i negativan utjecaj sagorijevanja fosilnih goriva na okoliš potaknuli su istraživanja proizvodnje biogoriva (Car, 2015).

Bioetanol se proizvodi procesom alkoholne fermentacije ugljikohidratne sirovine, najčešće voća i žitarica, te iziskuje male troškove. Nadalje, istražuje se i proizvodnjom etanola iz lignoceluloznih sirovina, jer se šećerne i škrobne sirovine koriste za prehranu čovječanstva i kao hrana za životinje.

Budući da potencijal rogača nije u potpunosti iskorišten, predmet brojnih istraživanja je i rogač kao potencijalna sirovina za proizvodnju bioetanola. Plod rogača izgleda kao mahuna, a pulpa mahune rogača sadrži visok udio šećera. Upravo visok udio fermentabilnih šećera uz njegovu nisku cijenu čini rogač dobrom sirovinom za proizvodnju bioetanola. Bioetanol se proizvodi procesom alkoholne fermentacije pomoću kvasca ili bakterija.

U ovom radu dan je pregled istraživanja potencijalne upotrebe ploda rogača u proizvodnji bioetanola s naglaskom na radne mikroorganizme i tipove vođenja bioprocesa.

## **2. PROIZVODNJA BIOETANOLA**

Bioetanol je etilni alkohol proizveden iz biomase koji se može koristiti kao gorivo. Proizvodi se procesom fermentacije (alkoholnog vrenja) sirovina bogatih škrobom, celulozom i jednostavnim šećerima. Alkoholna fermentacija je proces kojim se škrob ili šećeri uz pomoć djelovanja kvasaca ili nekih bakterija, odnosno enzima koji djeluju kao biokatalizatori, pretvara u etanol i CO<sub>2</sub> (Oros, 2013).

Za industrijsku proizvodnju bioetanol iz određenih sirovina potrebno je uzeti u obzir različite faktore koji utječu na taj proizvodni proces. Faktori koji se moraju uzeti u obzir su količina etanola koja se može dobiti iz jedinice mase sirovine, cijena i dostupnost sirovine, zatim cijena tehnološkog postupka. Cijena i dostupnost različitih sirovina se razlikuju u različitim dijelovima svijeta te je smisleno da svaka zemlja koristi one sirovine kojih ima najviše u njenom geografskom i klimatskom području (Rudela, 2015). Najvažnije sirovine za proizvodnju bioetanol su: šećerna trska, šećerna repa, sirak, kukuruz, krumpir, te lignocelulozne sirovine kao što su drvo, poljoprivredni ostatci, te trave. Sirovine bogate jednostavnim šećerima vrlo su pogodne za proizvodnju etanola, budući da već sadrže fermentabilne šećere kao što su glukoza i fruktoza. Kukuruz i krumpir su sirovine bogate škrobom koji prvo treba procesom enzimske ili kiselinske hidrolize razgraditi na jednostavne šećere, što zahtijeva još jednu fazu u procesu proizvodnje i povećava troškove. Još složeniju predobradu zahtijevaju lignocelulozne sirovine kao što su ostaci od poljoprivrede i drvne industrije budući da su građeni od celuloze, hemiceluloze i lignina koji su teško razgradivi. Nadalje, njihovom razgradnjom osim jednostavnih šećera nastaje i niz nusprodukata koji mogu biti toksični za radni mikroorganizam (Kumar i Sharma, 2017).

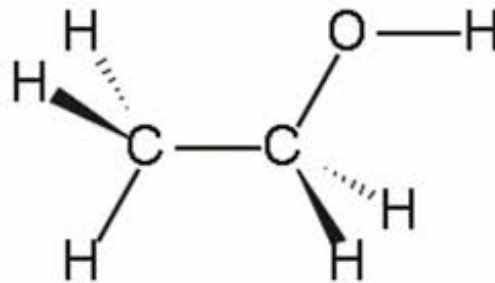
### **2.1. BIOETANOL**

Etanol je bezbojna tekućina karakterističnog mirisa koja lako isparava i lako je zapaljiva. Kemijska struktura etanola je C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH i pripada grupi organskih spojeva zvanj alkoholi (slika 1). Temperature tališta etanola je - 114,1° C a temperature vrelišta 78,5° C, dok je specifična gustoća 789 kg/m<sup>3</sup> pri 20°C. Gori svjetlo plavim plamenom i bez čađe. Veoma se dobro miješa s vodom i većinom organskih otopala te ga se zbog toga upotrebljava za dobivanje drugih kemikalija (boja, parfema i eksploziva). Prva proizvodnje etanola bila je za dobivanje jakih alkoholnih pića, a kasnije



za dobivanje biogoriva. Tokom posljednjih trideset godina proizvodnja bioetanola u svijetu porasla je za oko šest puta. Razlog tome je sve češće korištenje bioetanola kao zamjena dijela benzina za pogon motornih vozila (Rudela, 2015).

Najznačajniji proizvođači etanola kao goriva su Brazil i SAD. U SAD-u, 1998. god., zabilježena je proizvodnja bioetanola od 6,4 milijardi litara, a glavna sirovina bio je kukuruzni škrob. Nakon 2016. god. zabilježen je znatni porast u proizvodnji bioetanola, procijenjuje se da je godišnja proizvodnja 60,64 milijardi litara. Drugi najveći proizvođač bioetanola iz soka šećerne trske je Brazil, a nakon Brazila slijedi Europa (Robak i Balcerek, 2017).

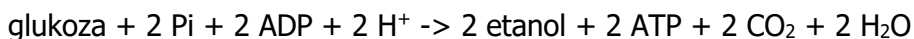


Slika 1. Strukturna formula etanola (Anonimno 1)

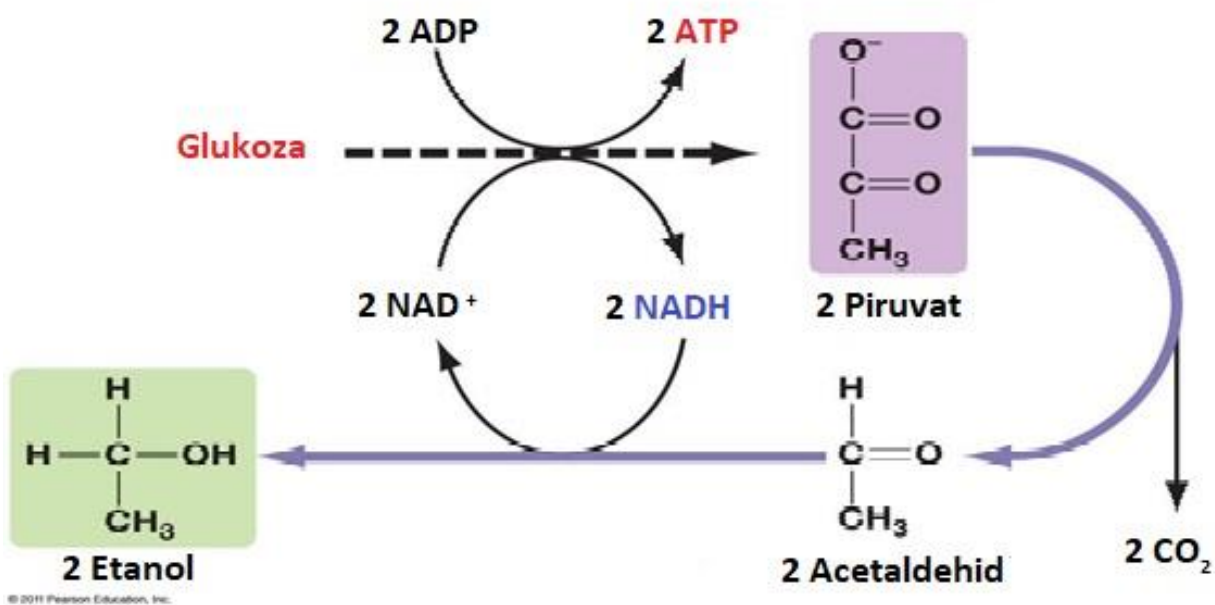
## 2.2. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija je biokemijski proces kojim se fermentabilni šećeri prevode u etanol i  $\text{CO}_2$  pomoću nužnih enzima koje posjeduju određeni kvasci i bakterije. Glikolizom se šećeri (glukoza, fruktoza) prevode u energiju (ATP i NADH) i građevne jedinice za stanične komponente, a kao konačni produkt glikolize dobiva se piruvat (Oros, 2013). Proces glikolize je niz od 10 reakcija kojima se glukoza prevodi u dvije molekule piruvata. Kako bi glikoliza mogla nesmetano teći nastali NADH mora se oksidirati da bi se obnovio  $\text{NAD}^+$ . U aerobnim organizmima NADH se oksidira u  $\text{NAD}^+$  u procesu oksidativne fosforilacije, dok se pri anaerobnim uvjetima  $\text{NAD}^+$  regenerira pri redukciji piruvata u laktat ili pri sintezi etanola iz piruvata, odnosno alkoholnoj fermentaciji. Piruvat se u prvoj reakciji alkoholne fermentacije dekarboksilira u acetaldehid koji se zatim reducira u etanol, pri čemu se NADH oksidira u  $\text{NAD}^+$  (M Berg, 2013) (slika 2).

Reakcija pretvorbe glukoze u etanol:



Potrebno je napomenuti da se sve češće koriste fermentacije na čvrstim supstratima (eng. *solid state fermentation*) (Sato i sur., 1988; Saharkhiz i sur., 2013; Mazaheri i sur., 2012). Mikrobn metabolizam regulira se aktiviranjem ili deaktiviranjem sinteze enzima, a sami enzimi su aktivni ili inhibirani supstratom i/ili produktom. Mikroorganizmi imaju kompleksne metaboličke puteve koji im omogućuju korištenje različitih nutrijenata i preživljavanje u različitim uvjetima okoline. (Oros, 2013).



Slika 2. Shema niza reakcija kojim se glukoza prevodi u etanol tijekom alkoholne fermentacije (Anonimno 4)

### 2.3. PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ RAZLIČITIH SIROVINA

Kao sirovina za proizvodnju bioetanolu mogu se koristiti svi ugljikohidratni supstrati koji se različitim kemijskim ili biokemijskim transformacijama mogu razgraditi do jednostavnih šećera koje kvasac može koristiti za svoj metabolizam. Šećeri koje mikroorganizmi u fermentaciji mogu koristiti su glukoza, fruktoza, saharoza i maltoza, a primjenom specijalnih kvasaca mogu se koristiti galaktoza i laktoza. Polisaharidi koji se mogu razgraditi do ovih fermentabilnih šećera (kemijski ili enzimski) su dekstrini, škrob, inulin, hemiceluloze i celuloze. Šećerne sirovine se mogu razgraditi direktno metaboličkim putem, te ne zahtijevaju skupu pripremu. Sirovine koje sadrže škrob i lignocelulozu su jeftinije od sirovina koje sadrže šećer, ali je prevođenje ovih sirovina do oblika koji je dostupan kvascima skupo i predstavlja nedostatak ovih supstrata. Jeftinije sirovine, kao otpadne vode raznih tehnologija, imaju veliki potencijal kao izvori fermentabilnih šećera. Koncentracija šećera u ovim sirovinama je niža nego u poljoprivrednim sirovinama (Rudela, 2015).

Alkoholna fermentacija jedan je od najstarijih proizvodnih procesa kojim je čovjek ovladao i u osnovi se nije promijenio do današnjih dana. Postupak dobivanja etanola iz celuloze se razvija i usavršavanju ovog postupka se poklanja velika pažnja, jer se time omogućava korištenje i ostalog biljnog materijala ili biljnog otpada iz raznih industrijskih postupaka (Rudela, 2015). Najčešće korištene sirovine za proizvodnju etanola u EU su pšenica, kukuruz i šećerna repa, a ostale sirovine su ječam, raž i tritikal (pšenični hibrid) (ePURE (european renewable ethanol) 2014). Započeta je proizvodnja bioetanolu iz šećerene trske u Brazilu i iz kukuruza u SAD-u (Ajanovic i Haas, 2014). Također, Francuska, Kina i Kanada proizvode bioetanol iz pšenice, kasave i soka slatkog sirka (Balan, 2014).

Do velikog značenja dolazi uporaba nekonvencionalnih sirovina u koju se mogu ubrojati sporedni i otpadni proizvodi različitih industrija i poljoprivredni otpad. Sirovine na bazi celuloze i hemiceluloze, iako su malo zastupljene u industrijskim razmjerima, trenutno se smatraju najperspektivnijim za buduću proizvodnju bioetanolu. Na današnjem nivou razvoja tehnologije procesi pretvorbe ovih sirovina do fermentabilnih šećera su ekonomski nepovoljni, ali se zbog niske cijene i velike dostupnosti polazne sirovine, danas ulaže u razvoj i unapređenje ovih tehnologija. Stoga je cilj buduću proizvodnju bioetanolu temeljiti na lignoceluloznoj masi. (Rudela, 2015)

Korištenje etanola kao goriva vezano je za početak automobilske industrije, iako su ga kasnije potisnula jeftina goriva na bazi nafte. O etanolu se opet počelo razmišljati kada su se pojavile prve naftne krize (Rudela, 2015). Danas je u svijetu najveći proizvođač bioetanola SAD, a zatim Brazil. Najviše šećerne trske u svijetu je proizvedeno u Brazilu. Za proizvodnju bioetnola se najviše koristi šećerna trska, jer je jeftina i dostupna sirovina. Etanol se prodaje kao čisti etanol ili kao mješavina s benzinom. Zamijenjeno je gotovo 42 % potrebe za benzinom koristeći bioetanol što benzin čini alternativnim gorivom u Brazilu (Car, 2015).

Vrijednost bioetanola kao biogoriva (čisti ili kao dodatak benzinu) je u tome što sadrži više kisika od benzina zbog čega mješavina „čišće izgara“ te nastaje manje štetnih plinova i zbog toga što ima veći oktanski broj (pokazuje koliko je motorno gorivo u stanju podnijeti kompresije prije samozapaljenja) što poboljšava osobine motora. Nedostaci etanola su to što veže vodu i sadrži 30 % manje energije u odnosu na benzin. Također, zbog korozivnosti etanola, automobili koji koriste etanol moraju imati posebno pripremljene motore. Pri proizvodnji bioetanola za motorna goriva mora se provesti dehidracija kako bi se dobio bezvodni etanol, koji se tek onda smije miješati s benzinom (ePURE (european renewable ethanol) 2014).

### 3. ROGAČ

Rogač (*Ceratonia siliqua* L.) je zimzeleno drvo koje pripada porodici mahunarki (*Leguminosae/Fabaceae*), rod *Ceratonia*, a potječe od grčke riječi *keras* (rog) i latinske riječi *siliqua* (mahuna), što se povezuje s čvrstoćom i oblikom mahune (Batlle i Tous, 1997) (slika 3). Rogač se godinama kultivira u zemljama Mediterana, obično na suhom i siromašnom tlu (Kumazawa i sur., 2002). Stari Grci su koristili rogač i donijeli su ga s područja Srednjeg Istoka u Grčku i Italiju. Arapi su proširili uporabu rogača duž cijele afričke obale sve do Španjolske i Portugala (Buneta, 2015). Rogač (*Ceratonia siliqua* L.) je autohtono mediteransko stablo, čiji plod ima široku upotrebu u kulinarstvu, medicini, proizvodnji stočne hrane te čije se sjemenke koriste za ekstrakciju gume (slika 5). Plod rogača je mahuna, koju čine pulpa (90%) i sjemenke (10%). Sadrži nizak udjel proteina (3-4%) i lipida (0,4-0,8%) te visok udjel polifenola (Marakis, 1996; Avallone, 1997) (slika 4).



Slika 3. Nezreli plodovi (mahune) rogača (Anonimno 5, 2015)



Slika 4. Plod (mahuna) rogača (Anonimno 6, 2015)

Kemijski sastav pulpe mahune ovisi o kultivaru, podrijetlu i periodu uzgoja (Albanell i sur., 1991). Pulpa rogača sadrži visok udjel šećera, od 48-56 % (uglavnom saharoza, glukoza, fruktoza i maltoza) te oko 18% celuloze i hemiceluloze (Puhan i Wielinga, 1996). Mahune rogača, zbog velikog udjela šećera u pulpi, koriste se kao hrana za ljude te u proizvodnji krmnih smjesa za

ishranu stoke. Također, koristi se kao kao slastica, a danas posebno kao zamjena za kakaov prah. Iz endosperma sjemenki ekstrahira se karuba guma koja je po svom kemijskom sastavu polisaharid, galaktomanan (Batlle i Tous, 1997). Čvrsto drvo rogača koristilo se za izradu posuđa te kao sporo izgarajući drveni ugljen (Hillcoat i sur., 1980). Neke sorte rogača su veoma cijenjene kao svježe voće (Strikić i sur., 2006).



Slika 5. Prikaz građe ploda (pulpa i sjemenke) i proizvoda od rogača (usitnjena mahuna te fini prah mahune rogača bez sjemenki) (Anonimno 2)

Procesom drobljenja mahune rogača odvajaju se sjemenke od pulpe. Zatim se pulpa samelje u fini prah koji se koristi u ljudskoj prehrani. Kemijski sastav finog praha pulpe se sastoji od 46% šećera, 7% proteina te različitih mineralnih tvari i vitamina (Whiteside, 1981). Fini prah rogača koristi se kao zamjena za kakaov prah jer ima manju kalorijsku vrijednost te ne sadrži kofein i teobromin (Whiteside, 1981; Craig i Nguyen, 1984). Aroma praha rogača podsjeća na aromu mliječne čokolade. Također, mahune rogača koriste se i u pripremi pripravaka za smirenje probavnih problema kao što si dijareja i povraćanje (Saura-Calixto i Cañellas, 1982).

## 4. PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ ROGAČA

### 4.1. PROIZVODNJA BIOETANOLA POMOĆU KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najvažnijih mikroorganizama koji je ujedno i najviše proučavan. Fakultativno je anaeroban i ima oksidativno-fermentativni metabolizam (Oros, 2013) te se najčešće primjenjuje u procesima alkoholne fermentacije (Saharkhiz i sur., 2013; Mazaheri i sur., 2012). Budući da ovaj kvasac ima visoku fermentacijsku aktivnost i dobro podnosi veće koncentracije etanola ispitan je njegov potencijal i u procesima alkoholne fermentacije rogača s ciljem dobivanja bioetanola.

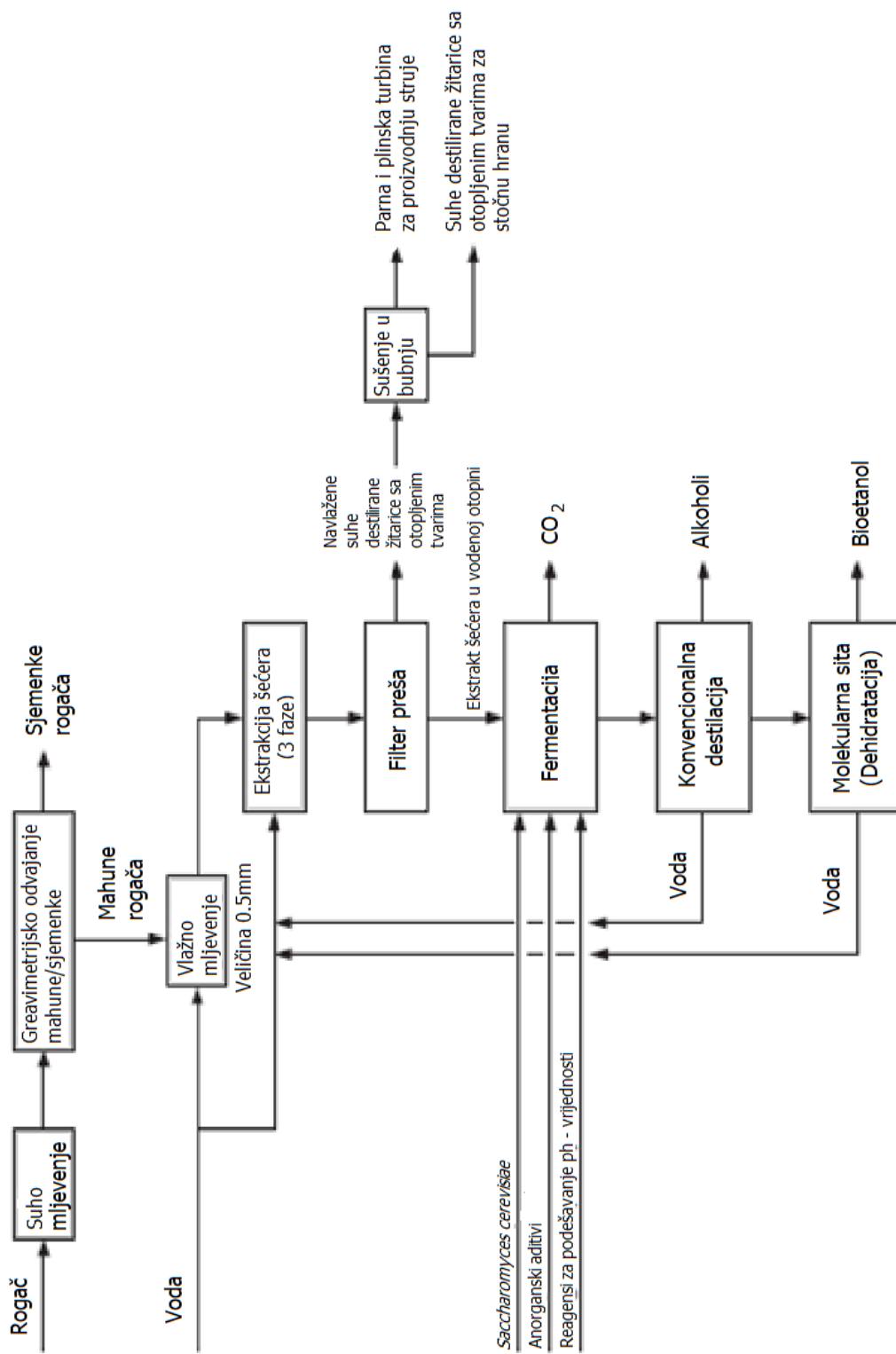
Prvu studiju proizvodnje bioetanola iz rogača pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* proveo je Roukas (1993). Fermentacija je provedena u fermentoru u anaerobnim uvjetima uz konstantno miješanje te u statičkim uvjetima. Maksimalna koncentracija etanola od 75 g/L postignuta je u fermentoru uz konstantno miješanje i početnu koncentraciju šećera od 200 g/L. Roukas je 1995. g. istražio i mogućnost proizvodnje etanola iz vodenog ekstrakta rogača pomoću imobiliziranih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Optimalni uvjeti fermentacije bili su pH 3,5-6,5, temperatura 30 °C te početna koncentracija šećera 250 g/L. U tim uvjetima prinos etanola bio je 28,3 % s maksimalnom koncentracijom etanola 64,5 g/L pri čemu se potrošilo 94 % ekstrahiranih šećera.

U novije vrijeme istraživanja su bila usmjerena na optimizaciju bioprocenih uvjeta tijekom proizvodnje bioetanola iz rogača. U nekoliko studija istraživani su uvjeti vodene ekstrakcije šećera iz rogača te fermentacijski parametri koji utječu na dobivenu koncentraciju etanola kao što su pH, količina inokuluma te izvor dušika (Turhan i sur., 2010). Optimalni pH komine pri proizvodnji etanola obično se kreće u rasponu od 5,0 do 5,5. Pri pH nižem od 4,0 dolazi do inhibicije proizvodnje etanola (Graves i sur., 2006). Općenito, do pada pH vrijednosti ispod optimalne za nastanak etanola dolazi zbog nastajanja organskih kiselina što na kraju rezultira i nižim prinosom etanola. Zbog toga je važno alkoholnu fermentaciju voditi uz kontrolu i održavanje optimalne pH vrijednosti. Prema Turhan i sur. (2010) optimalni pH za proizvodnju etanola iz rogača iznosi 5,5 i treba ga održavati tijekom trajanja bioprocena. Koncentracija etanola uz kontrolu i održavanje optimalnog pH tijekom bioprocena iznosila je 42,6 g/L dok je koncentracija etanola bez održavanja pH iznosila 40,17 g/L. Nadalje, fermentacija uz kontrolirani pH rezultirala je i boljim ostalim kinetičkim parametrima kao što su produktivnost od 3,37 g/L/h te maksimalna brzina rasta od 0,54 g/L/h u odnosu na fermentaciju bez kontrole pH (produktivnost od 3,26 g/L/h te maksimalna

brzina rasta od 0,1 g/L/h). Osim toga, tijekom fermentacije uz kontrolirani pH nastalo je i više biomase (7,35 g/L) u odnosu na fermentaciju bez kontrole pH (3,26 g/L). Količina inokuluma (*Saccharomyces cerevisiae*) također ima značajan utjecaj na proizvodnju etanola. Turhan i sur. (2010) ispitali su utjecaj tri različite količine inokuluma kvasca na kinetičke parametre alkoholne fermentacije rogača: 1 %, 3 % i 5 % volumena komine. Maksimalna koncentracija etanola (42,9 g/L) postignuta je primjenom inokuluma u iznosu od 3 %. Ova količina inokuluma pokazala se optimalnom i tijekom alkoholne fermentacije drugih supstrata kako što je melasa šećerne repe (El-Diwany i sur., 1992) te ošćerene stabljike suncokreta (Sharma i sur., 2002). Nadalje, kao najbolji izvor dušika koji je dodavan komini rogača pokazao se kvaščev ekstrakt.

Sanchez i sur. (2010) ispitali su potencijal tri različita komercijalno dostupna soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* za proizvodnju etanola iz rogača. Koncentracija etanola dosegla je maksimalnu vrijednosti od 95 g/L nakon 30 h fermentacije s dva kvasca dok je s trećim kvascem ona iznosila 70 g/L nakon 60 h. Slični rezultati postignuti su i tijekom fermentacija supstrata baziranih na šećernoj trsci (Cardona i Sanchez, 2007) te su bolji u odnosu na fermentaciju vodenog ekstrakta rogača uz istu početnu koncentraciju šećera (Roukas, 1994). Blok shema proizvodnje bioetanola iz rogača prikazana je na slici 6.





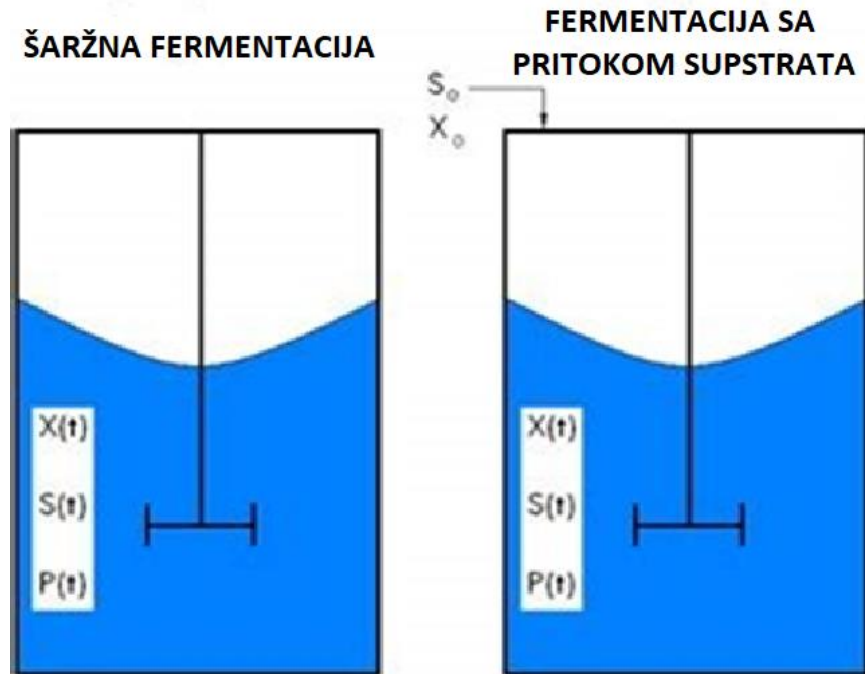
Slika 6. Blok shema proizvodnje bioetanol iz rogača (Sanchez i sur., 2010)

U usporedbi s ostalim sirovinama prikazanim u tablici 1 rogač se može smatrati održivom alternativnom sirovinom za proizvodnju bioetanola.

Tablica 1. Produktivnost etanola iz različitih sirovina (Sanchez i sur., 2010)

Sirovina	Produktivnost etanola (L/kg)
kukuruz	0,409
pšenica	0,360
rogač	0,320
šećerna repa	0,200
kasava	0,182
šećerna trska	0,082

Što se tiče načina vođenja procesa alkoholne fermentacije rogača, fermentacija s pritokom supstrata ima nekoliko prednosti u odnosu na šaržnu fermentaciju (slika 6). Prednostima se smatraju dobivena vrlo niska koncentracija neiskorištenog supstrata, viša koncentracija otopljenog kisika u mediju, smanjeno vrijeme trajanja fermentacije, viša produktivnost procesa, smanjeni inhibitorni efekti određenih sastojaka koji se nalaze u mediju i manja mogućnost kontaminacije medija (Roukas, 1993).



Slika 7. Shematski prikaz šaržne fermentacije i fermentacije s pritokom supstrata  
(Anonimno 3)

Nadalje, šaržna fermentacija i fermentacija s pritokom supstrata provedene su na dva načina, sa slobodnim i sa imobiliziranim stanicama *Saccharomyces cerevisiae*. Šaržna fermentacija sa slobodnim stanicama pokazala se kao proces koji ima manju produktivnost etanola te kao proces u kojem se dobiva visoka koncentracija biomase. Koncentracija biomase se mijenja slično kako se mijenja i koncentracija etanola tijekom provođenja fermentacije. U trenutku kada je zabilježena najviša koncentracija vijabilnih stanica, također je zabilježena i najviša koncentracija etanola. Očekivano, koncentracija šećera se smanjivala kako su se povećavale koncentracije etanola i biomase (Roukas, 1993).

Rezultati fermentacije s pritokom supstrata prikazuju porast biomase i etanola uz potrošnju šećera. Tijekom procesa fermentacije zabilježene su tri faze rasta: prva faza rasta na samom početku fermentacije, a zatim još dvije faze rasta povezane sa dodavanjem medija u dvije faze do postizanja željenog volumena u reaktoru. Faze rasta i konzumacija šećera smanjili su se tijekom akumuliranja etanola u uzastopnim fazama. U prvoj fazi rasta zabilježen je pad brzine rasta, zatim tijekom druge faze rasta stopa brzine rasta se toliko smanjila da je bila jedva mjerljiva.

Tijekom treće faze rasta, zbog velikog porasta koncentracije etanola, zabilježen je inhibitorni učinak etanola. Rastom koncentracije etanola uočen je njegov inhibitorni učinak na aktivnost kvasca (Lima-Costa, 2012).

Za proizvodnju etanola iz otpada od rogača u industrijskim pogonima optimalna početna koncentracija šećera iznosi 250 g/L (Rodrigues, 2015). Potvrđeno je da je optimalna početna koncentracija šećera 250 g/L te da je odličan prinos etanola i konverzije glukoze u etanol uz dodatak male količine ugljika i dušika u medij (Lima-Costa, 2012). Pri toj koncentraciji mikroorganizmi ne konzumiraju proizvedeni etanol u stacionarnoj fazi kao novi izvor ugljika za svoj rast i razvoj. Oksidacija glukoze je u potpunosti potisnuta, uvjeti su anaerobni tako da je katabolički metabolizam isključivo fermentacijski. Zabilježena je proizvodnja etanola u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi. Iako je pri ovoj koncentraciji glukoze invertaza inhibirana, nakon konzumacije glukoze onda se aktivira te hidrolizira saharozu. Visoka koncentracija slobodne vode omogućuje potpunu hidrolizu saharoze. Pri optimalnoj početnoj koncentraciji šećera stopa metabolizma je nešto sporija nego kod nižih koncentracija, međutim dobiva se najviša koncentracija etanola (Rodrigues, 2015). Utjecaj visoke koncentracije šećera na slabiju produktivnost fermentacije zbog utjecaja visokog osmotskog tlaka na ostale mikroorganizme se navodi i u drugim radovima (Saharkhiz i sur., 2013; Mazaheri i sur., 2012).

## 4.2. PROIZVODNJA BIOETANOLA POMOĆU BAKTERIJE *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas mobilis* je gram-negativna bakterija koja može metabolizirati glukozu i fruktozu Entner-Doudoroffovim putem. Jedini šećeri koje *Z. mobilis* može iskoristiti su glukozu, fruktozu i saharozu, a to su, također, šećeri koji se nalaze u rogaču (Saharkhiz i sur., 2013; Mazaheri i sur., 2012). Na temelju toga ispitana je mogućnost korištenja ove bakterije u proizvodnji bioetanola iz rogača.

U alkoholnoj fermentaciji kao supstrat se koristi dobiveni fini prah rogača koji je pomiješan sa destiliranom vodom i optimalnom koncentracijom bakterija *Zymomonas mobilis*, 5 %. Određena je optimalna pH-vrijednost (pH 5) kako bi se proizvela maksimalna količina produkta, etanola. Fermentacija je provedena u fermentoru u anaerobnim uvjetima pri 30 °C. Nakon određivanja ukupnih i reducirajućih šećera, te količine proizvedenog etanola zaključeno je da na količinu proizvedenog etanola utječu četiri ključne varijable. Najvažnije varijable za dobivanje maksimalne količine etanola su količina inokuluma, količina finog praha rogača, brzina miješanja suspenzije te vrijeme fermentacije. Visoka koncentracija šećera uzrokuje oštećenje stanica bakterija zbog povišenja osmotskog tlaka. Veća brzina miješanja tijekom fermentacije pospješuje otapanje kisika u otopini te promjenu iz anaerobnog u aerobni sustav što se očituje smanjenjem proizvodnje etanola (Saharkhiz i sur., 2013).

Nadalje, provedena je i submerzna alkoholna fermentacija komine koju čine komadići mahune rogača. Time je riješen problem nastajanja velike količine otpadnih voda i nije potrebna prethodna ekstrakcija šećera. Prednosti submerzne fermentacije u kojoj je supstrat u čvrstom stanju su proizvodnja manje količine otpadne vode te jeftinija priprema supstrata, jer nije potrebno usitnjavanje mahune rogača do finog praha već samo do komadića. Potrebno je uložiti manje energije u provođenje procesa fermentacije što se očituje manjom cijenom proizvodnog procesa i dobiva se veći prinos etanola (Mazaheri i sur., 2012).

U istraživanjima je ustanovljeno da je manja veličina čestica rogača optimalna, međutim Mazaheri i sur. su primjetili da je veća veličina čestica optimalna. Razlog tome bi mogao biti nastanak jačih adhezijskih sila među manjim česticama te veća koncentracija ekstrahiranih šećera. Time bi se mogla smanjiti cijena proizvodnog procesa. Međutim, manji omjer površine i volumena čestica rezultira manjom ukupnom površinom za rast bakterija. Optimalno vrijeme trajanja fermentacije je 40 sati (Mazaheri i sur., 2012).

Alkoholna fermentacija provedena je pomoću bakterije *Zymomonas mobilis* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te se kao supstrat koristio fini prah rogača. Količina proizvedenog etanola pri korištenju minimalne početne koncentracije šećera je veća uz pomoć bakterije *Zymomonas mobilis* u odnosu na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Međutim, povećanjem početne koncentracije šećera povećava se i osmotski tlak. Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* podnose viši osmotski tlak u odnosu na bakteriju *Zymomonas mobilis*. Brzina rotacije miješalice u fermentoru također utječe na rast i razvoj mikroorganizama. Većom brzinom rotacije dolazi do jače aeracije i većeg oksidativnog stresa. Takav stres bolje podnose stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* nego bakterije *Zymomonas mobilis*.

## 5. ZAKLJUČCI

Iz navedenih radova može se zaključiti:

1. Provođenje alkoholne fermentacije na rogaču jednostavnije je primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* jer je otporniji i izdržljiviji od bakterija *Zymomonas mobilis*. Podnosi veću koncentraciju etanola i kisika, viši osmotski tlak te vanjski utjecaj stresa kao što je miješanje.
2. Rogač je pogodna sirovina za proizvodnju bioetanola zbog visokog sadržaja fermentabilnih šećera (oko 50 %). Predobrada sirovine nije potrebna što proizvodni proces bioetanola čini jednostavnijim i jeftinijim.
3. Korištenjem mahune rogača kao sirovine u odnosu na otpad od rogača dobiva se veći prinos etanola. Primjena otpada od rogača znatno snizuje cijenu proizvodnog procesa.
4. Fermentacija provedena na supstratu u čvrstom stanju u odnosu na fermentacije gdje se kao supstrat koristi otpad od rogača suspendiran u mediju jednostavnija je, jeftinija te nastaje manja količina otpadnih voda.
5. Optimalna početna koncentracija šećera je 250g/L za proizvodnju bioetanola iz otpada od rogača.

## 6. LITERATURA

Ajanovic A., Haas R. (2014) On the future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU. *Applied Energy* **135**: 730-737.

Albanell E., Caja G., Plaixats J. (1991) Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes* **16**: 135-136.

Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A. (1997) Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis* **10(2)**: 166-172.

Balan V. (2014) Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *ISRN biotechnology* 1-31.

Battle I., Tous J. (1997) Carob tree: *Ceratonia siliqua* L.-Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. *Biodiversity International* **17**.

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2013) *Biokemija*, 6. Izd., str. 435 - 448.

Buneta A., (2015) *Rogač i mak kao izvori funkcionalnih sastojaka* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Food Engineering. Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products.).

Car A. (2015) *Proizvodnja bioetanola na obnovljivim sirovinama* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Biochemical Engineering. Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology.).

Cardona C. A., Sánchez Ó. J. (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology* **98**: 2415-2457.



Craig W. J., Nguyen T. T. (1984) Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *Journal of Food Science* **49**: 302-305.

El-Diwany A. I., El-Abyad M. S., El-Refai A. H., Sallam L. A., Allam R. F. (1992) Effect of some fermentation parameters on ethanol production from beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y-7. *Bioresource technology* **42**:191-195.

ePURE (2014) Renewable ethanol: driving jobs, growth and innovation throughout Europe, State of the industry report. ePURE - european renewable ethanol, <<http://www.epure.org>> Pristupljeno 05. lipnja 2018.

Graves T., Narendranath N. V., Dawson K., Power R. (2006) Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**: 469.

Hillcoat D., Lewis G., Verdcourt B. (1980) A new species of *Ceratonia* (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) from Arabia and the Somali Republic. *Kew Bulletin* **35**: 261-271.

Kumar A. K., Sharma S. (2017) Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and bioprocessing* **4(1)**: 7.

Lima-Costa M. E., Tavares C., Raposo S., Rodrigues B., Peinado J. M. (2012) Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **39**: 789–797.

Marakis S. (1996) Carob bean in food and feed: current status and future potentials - a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology* **33**: 365-383.

Marković I. (2012) *Proizvodnja bioetanolu integriranjem hidrolizom i fermentacijom pulpe šećerne repe* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Biochemical Engineering. Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology.).

Oros D. (2013) *Development of sustainable processes for bioethanol production* (Doctoral dissertation, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

Puhan Z., Wielinga M. W. (1996) Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). *Report Technical Committee of INEC (unpublished)* **12**: 123-127.

Robak K., Balcerek M. (2017) Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technology & Biotechnology* **56(2)**.

Rodrigues B., Peinado J. M., Raposo S., Constantino A., Quints C., Lima-Costa M. E. (2015) Kinetic and Energetic Parameters of Carob Wastes Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Crabtree Effect, Ethanol Toxicity, and Invertase Repression. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25(6)**: 837-844.

Roukas T. (1994) Solid-state fermentation of carob pod for ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**: 296-301.

Rudela N. (2015) *Biogoriva* (Doctoral dissertation, Polytechnic of Sibenik. Traffic.).

Saharkhiz S., Mazaheri D., Shojaosadati S. A. (2013) Evaluation of bioethanol production from carob pods by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid submerged fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **43**: 415-430.

Sánchez S., Lozano L. J., Godínez C., Juan D., Pérez A., Hernández F. J. (2010) Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Applied Energy* **87**: 3417-3424.

Saura-Calixto F., Cañellas J. (1982) Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **33**: 1319-1323.

Sharma S. K., Kalra K. L., Grewal H. S. (2002) Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresource Technology* **85**: 31–33.

Strikić F., Čmelik Z., Perica S. (2006) Morfološke osobine dva perspektivna tipa rogača (*Ceratonia siliqua* L.) s otoka Visa. *Pomologia Croatica* **4**: 245-253.

Turhan I., Bialka K. L., Demirci A., Karhan M. (2010) Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology* **101(14)**: 5290-5296.

Whiteside L. (1984) The carob cookbook. *HarperThorsons*.

Anonimno 1: Strukturna formula etanola, < <https://www.herald.co.zw/facts-about-ethanol-fires/> > Pristupljeno 5. lipnja 2018.

Anonimno 2 Prikaz građe ploda (pulpa i sjemenke) i proizvoda od rogača (usitnjena mahuna te fini prah mahune rogača bez sjemenki), < <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-014-9298-3> > Pristupljeno 5. lipnja 2018.

Anonimno 3 Prikaz šaržne fermentacije i fermentacije s pritokom u fermentor, < <https://userpages.umbc.edu/~xkang/ENCH772/modes.html> > Pristupljeno 7. lipnja 2018.

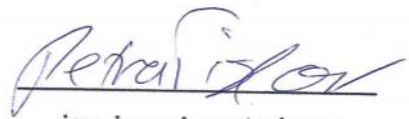
Anonimno 4 Shema niza reakcija kojim se glukoza prevodi u etanol, < <https://www.coursepics.com/lesson/alcohol-fermentation/> > Pristupljeno 22. lipnja 2018.

Anonimno 5 (2015) Nezreli plodovi (mahune) rogača, < <http://www.fragrantica.com/notes/Carob-tree-430.html> > Pristupljeno 07. lipnja 2015.

Anonimno 7 (2015) Plod (mahuna) rogača, < [http://www.traditionaloven.com/conversions\\_of\\_measures/carob-powder-flour-converter.html](http://www.traditionaloven.com/conversions_of_measures/carob-powder-flour-converter.html) > Pristupljeno 03. lipnja 2018.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Petar Ilić". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

ime i prezime studenta