



IZVORNI ZNANSTVENI RAD - ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Anaerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina***Anaerobic cultivation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the hydrolysates of lignocellulosic raw materials*****Mario Novak^a, Antonija Trontel^a, Mladen Pavlečić^a, Lucija Mušak^a, Darija Govedarica^a, Anja Lauder^a, Fran Ivančić^a, Božidar Šantek^{a*}**^a *Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Hrvatska*^a *Department for Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Hrvatska** - *autor za korespondenciju (email: bsantek@pbf.hr)***Sažetak**

Zbog velike rasprostranjenosti u prirodi i relativno niske cijene, lignocelulozne sirovine postaju zanimljive za primjenu u različitim biotehnološkim procesima. Međutim, zbog svoje kompleksne strukture, te sirovine moraju proći postupak predobrade u kojem uglavnom nastaju nusprodukti koji imaju inhibitorno djelovanje na proizvodni mikroorganizam i time utječu na ukupnu učinkovitost bioprocasa. U ovom istraživanju ispitivana je mogućnost korištenja hidrolizata pšenične slame i kukuruzovine za anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* odnosno s ciljem proizvodnje etanola. Postupak blago kisele predobrade lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru (pri 210°C; 20 bara; vrijeme zadržavanja 1 - 10 minuta; do 1,0 % H₂SO₄) korišten je za dobivanje hidrolizata lignoceluloznih sirovina pri čemu je najveći udjel ukupnih fermentabilnih šećera zabilježen kod postupka predobrade s 1,0 % H₂SO₄ i vremenom zadržavanja od 5 minuta. Anaerobni uzgoj kvasca na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina proveden je u Erlenmeyer tikvicama, te dodatno testiran u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su veće vrijednosti pokazatelja uspješnosti anaerobnog uzgoja kvasca zabilježene na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (u odnosu na hidrolizat kukuruzovine) u HRCB-u pri čemu su ostvarene ove vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa: $Y_{p/s} = 0,261 \text{ g g}^{-1}$, $Pr = 0,0678 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ i $E = 42 \%$. Na osnovi rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je potrebno dodatno optimizirati postupak predobrade lignoceluloznih sirovina kao i selekcionirati novi soj mikroorganizma koji ima sposobnost korištenja heksoza i pentoza odnosno visoku tolerantnost na nusprodukte koji nastaju postupkom predobrade lignoceluloznih sirovina.

Ključne riječi: lignocelulozne sirovine, anaerobni uzgoj, *Saccharomyces cerevisiae*, visokotlačni reaktor, horizontalni rotirajući bioreaktor (HRTB)

Abstract

Because of great abundance in nature and low price, lignocellulosic raw materials are becoming more interesting in different biotechnological processes. However, due to their complex structure, these materials must often undergo some kind of pretreatment in which some undesirable byproducts are formed. These byproduct have inhibitory effect on producing microorganism and they also affect bioprocess efficiency. During this research the possibility of using both wheat straw and corn stover hydrolysates during anaerobic cultivation of yeast *S. cerevisiae* for ethanol production was studied. Dilute acid pretreatment of lignocellulosic raw materials was studied in high pressure reactor (210°C; 20 bars; residence time of 1 - 10 minutes; up to 1,0 % H₂SO₄). The highest content of total fermentable sugars in the hydrolysates was obtained by pretreatment with 1,0 % H₂SO₄ and residence time of 5 minutes. Cultivation media containing hydrolysates of lignocellulosic raw materials were used for anaerobic cultivation of yeast in Erlenmeyer flask. Additionally, these media were also tested in horizontal rotating tubular bioreactor (HRTB). Results obtained during research in the HRTB show that higher bioprocess efficiency was observed by broth with wheat straw hydrolysate (compared to the corn stover hydrolysate) where the following bioprocess efficiency parameters were obtained: $Y_{p/s} = 0,261 \text{ g g}^{-1}$, $Pr = 0,0678 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ i $E = 42 \%$. On a basis of these results it is obvious that further optimization of bioprocess is required, especially optimization of the pretreatment of lignocellulosic feedstocks, selecting the new microbial strain that will be capable to use pentoses and hexoses for its physiological activity as well as high tolerance on the inhibitory byproducts formed during pretreatment of lignocellulosic raw materials.

Key words: lignocellulosic raw materials, anaerobic cultivation, *Saccharomyces cerevisiae*, high pressure reactor, horizontal rotating tubular bioreactor (HRTB)

Uvod

Proizvodnja biogoriva korištenjem obnovljivih sirovina predstavlja vrlo izazovno i trenutno popularno istraživačko područje. Ono što je važno istaknuti je dostupnost obnovljivih sirovina i njihova ekonomska vrijednost da bi se mogle uspješno primijeniti u procesu proizvodnje biogoriva. Lignocelulozne sirovine kao najčešći nusprodukti u šumarstvu i poljoprivredi odnosno u preradi drva i poljoprivrednih proizvoda imaju veliki potencijal za primjenu u proizvodnji biogoriva zbog toga što su trenutno relativno jeftine i lako dostupne sirovine (Nigam i Pandey 2009; Philippoussis 2009; Wang i sur. 2011; Svetlitchnyi i sur. 2013; Kang i sur. 2014; Chen i Fu 2016). Da bi se ove sirovine mogle uspješno primijeniti u proizvodnji biogoriva potrebno je poznavati njihov sastav zbog procjene ekonomske održivosti proizvodnje biogoriva, te zadovoljavanja kriterija održivog razvoja (Balat 2011; Rezić i sur. 2016). Tri su osnovna sastojka lignoceluloznih sirovina, lignin, hemiceluloza i celuloza, a njihov udio ovisi o porijeklu i vrsti sirovine (Hamelinck i sur. 2005; Ivančić Šantek i sur. 2016). Zbog svoje kompleksne strukture i promjenjivog sastava to su vrlo zahtjevni supstrati za proces standardizacije (uključujući i vrlo zahtjevan proces predobrade) procesa proizvodnje biogoriva. Celuloza je glavna strukturalna komponenta lignoceluloznih sirovina koja čini 35 - 50 % suhe tvari tih sirovina. Homo-polisaharid je s ponavljajućim β -D-glukopiranoznih jedinica povezanim preko hidroksilnih skupina C1 i C4 atoma β -glikozidnim vezama (Hadar 2013; Bajpai 2016) s prosječnom molekularnom masom od 100 000 Da. Hemiceluloza je prirodni polimer koji čini 20 - 35 % suhe tvari lignoceluloznih sirovina. To je visoko razgranati hetero-polisaharid (Wyman 1996, Sun i Cheng 2002) koji se sastoji od pentoza (ksiloza i arabinoza) i heksoza (glukoza, manoza i galaktoza). Prisutnost određenih šećera ovisi o vrsti sirovine, a najrašireniji oblik je ksilan (Schobert 2013; Bajpai 2016). Lignin, polimer visoke molekulske mase doprinosi mehaničkoj čvrstoći drvenastih biljaka i otpornosti. Kao i kod celuloze i hemiceluloze, postotak lignina u staničnom zidu je promjenjiv (10 - 25 % suhe tvari sirovine) i ima značajan utjecaj na djelotvornost razgradnje celuloze i hemiceluloze (Bajpai 2016). Nadalje, lignin može uzrokovati dosta problema prilikom korištenja ovih sirovina za proizvodnju biogoriva. Tako npr. lignin je fizička barijera koja usporava proces enzimske hidrolize celuloze pomoću celulaza odnosno njegovom kiselinskom razgradnjom nastaju fenolni spojevi (npr. vanilin, dihidrokoniferil-alkohol, koniferil-aldehid, hidrokinon, acetogvajakon, homovanilinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina) koji inhibiraju rast radnih mikroorganizma (Jørgensen i sur. 2007; Kumar i sur 2009; Alviera i sur 2009; Svetlitchnyi i sur. 2013; Kang i sur. 2014; Ivančić Šantek i sur 2016; Chen i Fu 2016).

Da bi se lignocelulozne sirovine mogle koristiti u proizvodnji biogoriva neophodan je proces njihove predobrade koji značajno utječe na ekonomsku održivost cijelog procesa proizvodnje biogoriva. Tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina najčešće se uklanjanje lignin, a kristalična celuloza se prevodi u amorfni oblik koji je puno pogodniji oblik za daljnju enzimsku hidrolizu celuloze. Postoje četiri metode predobrade: (i) fizikalne (mljevenje, zračenje, tretman parom, piroliza), (ii) kemijske (tretiranje kiselinama, lužinama, organskim otapalima), (iii) fizikalno-kemijske te (iv) biološke me-

tode (Alriksson 2006; Rezić i sur 2016; Ivančić Šantek i sur. 2016). Proces predobrade lignoceluloznih sirovina se još uvijek intenzivno istražuje zbog toga što i dalje postoji mogućnost za unapređenje ovog dijela bioprocasa (Kumar i sur., 2009, Svetlitchnyi i sur. 2013; Kang i sur. 2014; Chen i Fu 2016). Također, nusprodukti koji nastaju procesom predobrade, potencijalno su inhibitori rasta mikroorganizama koji se koristi u proizvodnji etanola. Njihova koncentracija ovisi o vrsti sirovine i procesu njene predobrade, a mogu značajno utjecati na prinos etanola i produktivnost samog bioprocasa (Parawira i Tekere, 2010.).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost korištenja hidrolizata lignoceluloznih sirovina (polučvrstog supstrata) za anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama i horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB). Hidrolizati lignoceluloznih sirovina (kukuruzovina i pšenična slama) dobiveni su predobradom u visokotlačnom reaktoru uz primjenu slabo kiselog postupka predobrade.

Materijali i metode

Sirovine

Lignocelulozne sirovine korištene tijekom ovog istraživanja bile su kukuruzovina (92,61 % st. v.) i pšenična slama (92,86 % s. tv). Ove sirovine su prikupljene na području sjeverozapadne Hrvatske, te su usitnjene u mlinu čekičaru s veličinom okna sita od 5 mm. Tako usitnjena lignocelulozna sirovina (čestice promjera do 5 mm) korištena je u procesu predobrade u visokotlačnom reaktoru.

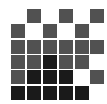
Predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru

Usitnenoj lignoceluloznoj sirovini (500 g s. tv.; kukuruzovina ili pšenična slama) dodana je vodovodna voda i razrijeđena H_2SO_4 (0,5 % ili 1,0 % m/m H_2SO_4) tako da je ukupni volumen suspenzije u visokotlačnom reaktoru bio 10,0 L. Proces predobrade proveden je na 210 °C (pri tlaku od 20 bara) kod različitih vremena zadržavanja (t_z ; Tablica 1.) Nakon predobrade, hidrolizati lignoceluloznih sirovina su neutralizirani (pH = 7) dodatkom $Ca(OH)_2$, te centrifugirani na 5000 min⁻¹ kroz 10 min. Dobiveni supernatanti su korišteni u daljnjem istraživanju.

Tablica 1. Predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru kod različitih uvjeta.

Table 1. Pretreatment of lignocellulosic raw materials in high pressure reactor by different conditions.

$\frac{m_{\text{sirovine}}}{m_{\text{raw materials}}}$ (g)	T (°C)	$P_{\text{pare}}/P_{\text{steam}}$ (bar)	V_0 (L)	$w_{H_2SO_4}$ (% m/m)	t_z (min)
500	210	20	10	1,0	1,0
500	210	20	10	1,0	5,0
500	210	20	10	1,0	10,0
500	210	20	10	0,5	5,0



Radni mikroorganizam i hranjive podloge

U ovom istraživanju kao radni mikroorganizam korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma bila je ovog sastava: glukoza ($50,0 \text{ gL}^{-1}$), kvašičev ekstrakt ($1,5 \text{ gL}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($1,0 \text{ gL}^{-1}$) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($1,0 \text{ gL}^{-1}$). Hranjivim podlogama koje su sadržavale hidrolizate lignoceluloznih sirovina (Tablici 2) dodane su ove komponente: kvašičev ekstrakt ($1,5 \text{ gL}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($1,0 \text{ gL}^{-1}$) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($1,0 \text{ gL}^{-1}$). Kontrolna podloga za uzgoj kvasca na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u Erlenmeyer tikvicama sadržavala je: glukozu ($7,0 \text{ gL}^{-1}$), ksilozu ($6,0 \text{ gL}^{-1}$), arabinozu ($1,0 \text{ gL}^{-1}$), kvašičev ekstrakt ($1,5 \text{ gL}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($1,0 \text{ gL}^{-1}$) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($1,0 \text{ gL}^{-1}$). Prije procesa inokulacije hranjive podloge su sterilizirane na $121 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ min}$.

Tablica 2. Sastav monosaharida prisutnih u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (predobrada pri $210 \text{ }^\circ\text{C}$, tlaku 20 bara, vremenu zadržavanja 5 minuta i 1,0 % H_2SO_4)

Table 2. Composition of monosaccharides present in the hydrolysates of lignocellulosic raw materials (pre-treatment at $210 \text{ }^\circ\text{C}$, pressure 20 bars, residence time of 5 minutes and 1,0 % H_2SO_4).

Sastojak/ Component	Hidrolizat pšenične slame/ Wheat straw hydrolysate	Hidrolizat kukuruzovina/ Corn stover hydrolysate
Glukoza/Glucose (gL^{-1})	7,19	4,65
Ksiloza/Xylose (gL^{-1})	2,54	5,85
Arabinoza/ Arabinose (gL^{-1})	0,86	1,11

Anaerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U prvom dijelu ovog istraživanja anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* proveden je u Erlenmeyer tikvicama od 500 mL s 300 mL hranjive podloge koje su inokulirane s 10 % v/v suspenzije kvasca. Uzgoj je proveden na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u Erlenmeyer tikvicama začepljenim s vrenjačama. U drugom dijelu ovog istraživanja za anaerobni uzgoj kvasca korišten je horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) čija unutrašnjost je karakterizirana s dva lopatasta mješala pričvršćena za stijenku bioreaktora. HRCB je izrađen od nehrđajućeg čelika, a opremljen je sustavom za praćenje temperature, tlaka i regulaciju načina i brzine rotacije bioreaktora. Ukupni volumen HRCB je 30 L, a sterilizira se direktnom parom. U ovom dijelu istraživanja korištena je intervalna rotacija, pri čemu je HRCB rotirao 12 minuta unutar jednog sata brzinom od 20 okr min^{-1} , dok je preostalo vrijeme (48 minuta) bio u mirovanju.

Hranjiva podloga sastavljena od hidrolizata lignoceluloznih sirovina korištena u ovom dijelu istraživanja bila je istog sastava kao i hranjiva podloga za preliminarna istraživanja u Erlenmeyer tikvicama. Ukupni volumen hranjive podloge u HRCB je bio 5 L, a bioreaktor je inokuliran s 10 % v/v suspenzije kvasca. Bioprocis je proveden na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do potpune potrošnje heksoza iz hranjive podloge.

Analitičko praćenje dinamike odvijanja bioprocisa

Analiza početnog sastava i hidrolizata lignoceluloznih sirovina (strukturni ugljikohidrati, lignin topiv i netopiv u kiselini, acetat, netopiv ostatak u kiselini) provedena je prema NREL metodama (Sluiter i sur. 2012). Koncentracija suhe tvari biomase kvasca određivana je gravimetrijskom metodom. Uzorak hranjive podloge je centrifugiran 15 minuta pri 4500 min^{-1} . Kivete s talogom kvašičeve biomase sušene su na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase, a dobiveni podaci su iskorišteni za određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca. Supernatant je korišten za određivanje koncentracije šećera, etanola i drugih produkata metabolizma kvasca kao i za određivanje inhibitora rasta kvasca prisutnih u hranjivoj podlozi. Brojčana koncentracija stanica kvasca određena je standardnom mikrobiološkom metodom (Petrijeve zdjelice sa sladnim agarom; $30 \text{ }^\circ\text{C}/48 \text{ h}$).

Koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze, octene, levulinske i mravlje kiseline, etanola i drugih produkata metabolizma kvasca u supernatantima izuzetih uzoraka određene su pomoću kromatografa Shimadzu CLASS-VP LC-10A/VP (Shimadzu, Kyoto, Japan) s predkolumnom (SupelcogelTM H), kolumnom (SupelcogelTM C-610H) i detektorom indeksa loma. Supernatanti uzoraka su prije kromatografskih analiza obrađeni s 10 % otopinom ZnSO_4 , a potom nakon 20 minuta mirovanja centrifugirani na 10000 min^{-1} kroz 10 minuta. Dobiveni supernatanti su filtrirani (veličina pora filtera $0,2 \text{ }\mu\text{m}$), te korišteni za kromatografske analize. Na osnovi koncentracija glukoze, ksiloze i arabinoze određene kromatografskom analizom izračunati su udjeli glukana, ksilana i arabinana u suhoj tvari sirovine prema literaturi (Jaunbaro i Puigjaner 1985, Sluiter i sur. 2012). Udjel ukupnih ugljikohidrata dobiven je kao zbroj udjela glukana, ksilana i arabinana.

Određivanje koncentracije ukupnih furana (furfural i 5-hidroksi-metilfurfural) u supernatantima izuzetih uzoraka provedeno je prema Martinez i sur. (2000), a dobiveni podaci su primjenjeni za izračunavanje udjela ukupnih furana. Udjel netopivog lignina u kiselini (eng. acid-insoluble lignin) u čvrstoj fazi hidrolizata lignoceluloznih sirovina određen je prema tzv. TAPPI metodi (Sluiter i sur. 2012). Topivi lignin u kiselini (eng. acid-soluble lignin) u tekućoj fazi hidrolizata lignoceluloznih sirovina određen je nakon filtracije (filter $0,2 \text{ }\mu\text{m}$) spektrofotometrijski mjerenjem absorbancije na 205 nm prema tzv. TAPPI metodi (Sluiter i sur. 2012).

Pokazatelji uspješnosti bioprocisa

U ovom istraživanju određeni su ovi pokazatelji uspješnosti biotehnološkog procesa:

Prinos produkata (Y_p):

$$Y_p = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad (1)$$

gdje je P_0 - koncentracija produkta na početku odnosno P - koncentracija produkta na kraju bioprocisa [gL^{-1}].

Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{p/s}$):

$$Y_{p/s} = (P - P_0) / (S_0 - S) \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (2)$$

gdje je S_0 - koncentracija supstrata na početku odnosno S - koncentracija supstrata na kraju bioprocisa [gL^{-1}].

$$E = \frac{Y_{p/S \text{ stvarni}}}{Y_{p/S \text{ teorijski}}} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je $Y_{p/S \text{ teorijski}} = 0.51 \text{ g g}^{-1}$ za konverziju glukoze u etanol.

Produktivnost bioprocesa (Pr):

$$P_r = Y_p / t_u \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (4)$$

gdje je t_u - ukupno vrijeme trajanja uzgoj [h].

Rezultati i rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je proučiti anaerobni uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina nakon njihove predobrade u visokotlačnom reaktoru uz primjenu blago kiselog postupka predobrade. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* proveden je u Erlenmeyer tikvicama, te je dodatno testiran u HRCB da bi se dobili pouzdani podaci za daljnja istraživanja odnosno povećanje mjerila bioprocesa.

Analiza sastava i predobrada lignoceluloznih sirovina

U tablici 3 prikazani su rezultati analiza sastava početnih sirovina iz koje je vidljivo da je sastav pšenične slame bio: 43,70 % glukana, 21,83 % ksilana, 3,37 % arabinana, 0,27 % lignina topivog u kiselini, 10,48 % lignina netopivog u kiselini, 1,65 % octene kiseline i ostalih sastojaka 18,70 % u suhoj tvari pšenične slame. Ostali sastojci u suhoj tvari pšenične slame (ili kukuruzovine) su udjel pepela, proteina i svih ostalih sastojaka pšenične slame. Udjel ukupnih ugljikohidrata u suhoj tvari pšenične slame korištene u ovom istraživanju iznosio je 68,9 %. Potrebno je istaknuti da je relativno veliki udjel octene kiseline posljedica postupka blago kisele hidrolize sirovine pri čemu ona nastaje kao nusprodukt ovog postupka. Dobiveni rezultati analiza pšenične slame su u skladu s literaturnim podacima (Boe i sur. 2007; Pointner i sur. 2014) iako ima odstupanja koja su vjerojatno posljedica različitih sorti pšenica, primjenjenih agrotehničkih mjera i klimatskih uvjeta tijekom kultivacije pšenice. Analiza sastava kukuruzovine pokazala je da ona sadrži u suhoj tvari sirovine: 40,32 % glukana, 16,38 % ksilana, 3,49 % arabinana, 0,15 % lignina topivog u kiselini, 23,00 % lignina netopivog u kiselini, 3,57 % octene kiseline i 13,09 % ostalih sastojaka u suhoj tvari kukuruzovine. Udjel ukupnih ugljikohidrata u suhoj tvari kukuruzovine iznosio je 60,19 %, a dobiveni podaci su u skladu s literaturom (Pordesimo i sur. 2005; Lee i sur. 2007).

Tablica 3. Sastav suhe tvari lignoceluloznih sirovina
Table 3. Dry matter composition of lignocellulosic raw materials

Sirovina/Raw material	Pšenična slama/ Wheat straw	Kukuruzovina/ Corn stover
Sastojak/Component	% [m/m]	% [m/m]
Glukani/Glucans	43,70	40,32
Ksilani/Xylans	21,83	16,38
Arabinani/Arabinans	3,37	3,49
Lignin topiv u kiselini/ Acid soluble lignin	0,27	0,15
Lignin netopiv u kiselini/ Acid nonsoluble lignin	10,48	23,00
Octena kiselina/Acetic acid	1,65	3,57
Ostalo /Residue	18,70	13,09

Rezultati postupaka predobrade lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru uz primjenu blago kiselog postupka prikazani su u Tablici 4 za pšeničnu slamu odnosno u Tablici 5 za kukuruzovinu. Iz rezultata prikazanih u Tablici 4 vidljivo je da u krutoj fazi hidrolizata ima preko 87 % lignina netopivog u kiselini kod svih postupaka predobrade s 1,0 % H_2SO_4 . Kod vremena zadržavanja od 1 i 10 minuta u krutoj fazi hidrolizata registriran je i određeni udjel mravlje kiseline kao posljedica nedovoljnog ispiranja uzoraka krute faze hidrolizata. Kod postupka predobrade s 0,5 % H_2SO_4 uz zadržavanje od 5 minuta uočeno je signifikantno povećanje udjela glukana u krutoj fazi hidrolizata odnosno smanjenje udjela lignina netopivog u kiselini kao posljedica uvjeta predobrade koji su neadekvatni za potpunu hidrolizu pšenične slame. U tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame najveći udjel ukupnih šećera od 46,05 % registriran je kod postupka predobrade s 1,0 % H_2SO_4 uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta (uz samo 4,77 % lignina topivog u kiselini), te uz najmanji udjel ukupnih (mravlja, octena i levulinska) kiselina i ukupnih furana. Kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1,0 % H_2SO_4 detektiran je najveći udjel ukupnih kiselina uz najmanji udjel ukupnih furana. U tim uvjetima ukupni šećeri kao i produkti njihove hidrolize (furfural koji nastaje razgradnjom pentoza odnosno hidroksimetilfurfural nastaje razgradnjom heksoza) se razgrađuju na mravlju, octenu i levulinsku kiselinu čiji su najveći udjeli registrirani u tim uvjetima predobrade. Prethodno navedeno opažanje je u skladu s literaturom (Palmqvist i Hahn-Hägerdal 2000; Klinke i sur. 2004). Kod postupka predobrade s 0,5 % H_2SO_4 uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta u tekućoj fazi hidrolizata registriran je relativno veliki udjel ukupnih šećera iako nije došlo do potpune hidrolize ugljikohidrata prisutnih u pšeničnoj slami. Nadalje, u tim uvjetima zabilježen je najmanji udjel ukupnih kiselina uz relativno veliki udjel ukupnih furana što pokazuje da tijekom procesa predobrade nije došlo do njihove značajnije razgradnje. Prethodno navedena pojava u skladu je s literaturnim podacima (Sun i Cheng 2002; Kang i sur. 2014).



Tablica 4. *Sastav krutog i tekućeg dijela hidrolizata pšenične slame dobivenog kod različitih uvjeta predobrade.*

Table 4. *The composition of solid and liquid part of wheat straw hydrolysate obtained by different pretreatment conditions.*

Sirovina/ Feedstock	Pšenična slama / Wheat straw							
	10 min zadržavanja, 1,0 % H ₂ SO ₄ / 10 min residence time, 1,0 % H ₂ SO ₄		5 min zadržavanja, 1,0 % H ₂ SO ₄ / 5 min residence time, 1,0 % H ₂ SO ₄		1 min zadržavanja, 1,0 % H ₂ SO ₄ / 1 min residence time, 1,0 % H ₂ SO ₄		5 min zadržavanja, 0,5% H ₂ SO ₄ / 5 min residence time, 0,5% H ₂ SO ₄	
Uvjeti predobrade / Pretreatment conditions	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part
Sastojak/ Component	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]
Glukani/ Glucans	6,06	3,78	10,00	29,95	5,02	19,25	53,68	39,64
Ksilani/ Xylans	1,67	14,73	1,77	11,91	1,90	16,62	0,00	29,21
Arabinani/ Arabinans	0,82	4,68	0,00	4,19	0,36	3,42	0,00	6,18
Lignin topiv u kiselini/ Acid soluble lignin	0,00	5,93	0,00	4,77	0,00	5,28	0,00	4,54
Lignin netopiv u kiselini/ Acid nonsoluble lignin	87,11	0,00	88,23	0,00	88,46	0,00	46,32	0,00
Mravlja kiselina/ Formic acid	4,34	24,70	0,00	18,30	4,27	12,84	0,00	6,11
Octena kiselina/ Acetic acid	0,00	7,23	0,00	6,79	0,00	5,15	0,00	4,04
Levulinska kiselina/ Levulinic acid	0,00	31,42	0,00	14,52	0,00	22,75	0,00	1,36
Ukupni furani/ Total furans	0,00	7,52	0,00	9,57	0,00	14,67	0,00	8,92

Rezultati predobrade kukuruzovine pokazuju da je u krutoj fazi hidrolizata zaostao uglavnom lignin netopiv u kiselini koji čini preko 93 % suhe tvari krute faze hidrolizata (Tablica 5), a što je uočeno kod predobrade s 1,0 % H₂SO₄ za sva ispitivana vremena zadržavanja. Kod postupka predobrade s 0,5 % H₂SO₄ i vremena zadržavanja od 5 minuta uočen je porast udjela glukana u krutoj fazi hidrolizata što pokazuje da uvjeti predobrade ne osiguravaju potpunu hidrolizu polisaharida prisutnih u kukuruzovini. Stoga je udjel lignina netopivog u kiselini smanjen na 53,66 %. U ovom slučaju detektirana je i prisutnost mravlje kiseline kao posljedica nedovoljnog ispiranja uzorka krute faze hidrolizata. U svim ostalim postupcima predobrade u krutoj fazi hidrolizata kukuruzovine nisu detektirane mravlja, octena i levulinska kiselina odnosno ukupni furani. U tekućoj fazi hidrolizata najmanji udjel ukupnih šećera od 30,75 % zabilježen je kod postupka predobrade s 1,0 % H₂SO₄ uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta. Kod tog postupka predobrade zabilježeni su i najveći udjeli mravlje, octene i levulinske kiseline kao posljedica razgradnje šećera odnosno

produkata njihove razgradnje (furfurala i hidroksimetilfurfurala). Prethodno navedeno opažanje je u skladu s literaturom (Palmqvist i Hahn-Hägerdal 2000; Klinke i sur. 2004). Kod predobrade kukuruzovine s 1,0 % H₂SO₄ najveći udjel ukupnih šećera od 36,93 % zabilježen je kod vremena zadržavanja od 5 minuta. Skraćivanjem vremena zadržavanja kod ovih postupka predobrade rezultiralo je blagim smanjenjem udjela ukupnih kiselina (mravlja, octena i levulinska) odnosno ukupnih furana. Smanjenje koncentracije sumporne kiseline na 0,5 % uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta dalo je najveći udjel ukupnih šećera od 51,18 % uz zaostajanje relativno velikog udjela glukana i ksilana u krutoj fazi hidrolizata što pokazuje da odabrani uvjeti predobrade ne omogućavaju zadovoljavajuću hidrolizu kukuruzovine. Istovremeno u tekućoj fazi ovog hidrolizata zabilježen je najveći udjel ukupnih furana uz značajno smanjenje udjela levulinske kiseline što pokazuje da se u tim uvjetima predobrade značajno usporava proces razgradnje hidroksimetilfurfurala (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000; Klinke i sur., 2004).

**Tablica 5.** Sastav krutog i tekućeg dijela hidrolizata kukuruzovine dobivenog kod različitim uvjeta predobrade.**Table 5.** The composition of solid and liquid part of corn stover hydrolysate obtained by different pretreatment conditions.

Sirovina / Feedstock	Kukuruzovina / Corn stover							
	10 min zadržavanja, 1,0 % H ₂ SO ₄ / 10 min residence time, 1,0 % H ₂ SO ₄		5 min zadržavanja, 1,0 % H ₂ SO ₄ / 5 min residence time, 1,0 % H ₂ SO ₄		1 min zadržavanja, 1,0 % H ₂ SO ₄ / 1 min residence time, 1,0 % H ₂ SO ₄		5 min zadržavanja, 0,5 % H ₂ SO ₄ / 5 min residence time, 0,5 % H ₂ SO ₄	
Uvjeti predobrade / Pretreatment conditions	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part	kruti dio/ solid part	tekući dio/ liquid part
Sastojak/ Component	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]	% [m/m]
Glukani/ Glucans	0,63	7,30	1,26	13,49	6,06	11,75	35,34	22,40
Ksilani/ Xylans	0,08	17,98	0,00	19,56	0,29	19,85	5,28	21,67
Arabinani/ Arabinans	0,04	5,51	0,00	3,88	0,10	4,16	0,00	7,11
Lignin topiv u kiselini/ Acid soluble lignin	0,00	4,06	0,00	3,37	0,00	6,38	0,00	4,90
Lignin netopiv u kiselini/ Acid nonsoluble lignin	99,26	0,00	98,74	0,00	93,56	0,00	53,66	0,00
Mravlja kiselina/ Formic acid	0,00	21,80	0,00	17,90	0,00	18,09	5,71	16,32
Octena kiselina/ Acetic acid	0,00	10,09	0,00	8,88	0,00	9,53	0,00	8,65
Levulinska kiselina/ Levulinic acid	0,00	28,72	0,00	27,65	0,00	24,39	0,00	2,96
Ukupni furani/ Total furans	0,00	4,54	0,00	5,26	0,00	5,85	0,00	15,99

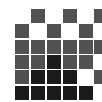
Iz prethodno prikazanih rezultata može se uočiti da je u krutoj fazi hidrolizata zastao uglavnom lignin netopiv u kiselini (> preko 87 %) što pokazuje da blago kiselim postupkom predobrade ne dolazi do značajnije razgradnje lignina prisutnog u ovim lignoceluloznim sirovinama. Tijekom ovih istraživanja najveća uspješnost procesa hidrolize polisaharida (celuloza i hemiceluloze) prisutnih u ovim lignoceluloznim sirovinama je iznosila za pšeničnu slamu 66,84 % odnosno za kukuruzovinu 61,36 %. Međutim, potrebno je također istaknuti da su dobiveni i relativno veliki udjeli ukupnih kiselina i furana u tekućoj fazi hidrolizata kao posljedica uvjeta predobrade tih sirovina. Zbog toga je neophodno provesti daljnji postupak optimizacije procesa predobrade s ciljem povećanja uspješnosti procesa hidrolize polisaharida prisutnih u tim lignoceluloznim sirovinama odnosno smanjenja brzine nastajanja nusprodukata samog procesa predobrade.

Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u Erlenmeyer tikvicama

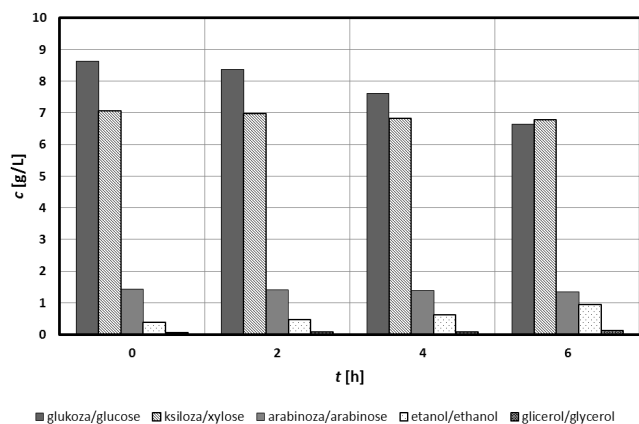
U ovom dijelu istraživanja provedena su preliminarna istraživanja anaerobnog uzgoja prirodnog izolata kvasca *S. cerevisiae* na kontrolnoj hranjivoj podlozi i hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (pšenična slama i kukuruzovina). Osnovi ciljevi ovog dijela istraživanja bili su

definirati sposobnost izoliranog soja kvasca *S. cerevisiae* da raste na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina odnosno da metabolizira pojedine monosaharide prisutne u ovim hranjivim podlogama kao i definirati otpornost na prisutne inhibitore rasta kvasca. Kontrolna podloga je po svom sastavu bila slična hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, ali nije sadržavala inhibitore rasta kvasca koji nastaju tijekom blago kiselog postupka predobrade lignoceluloznih sirovina. U hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina bilo je prisutno ukupno preko 10 g L⁻¹ šećera (glukoza, ksiloza i arabinoza), a da bi se pospješio rast izoliranog soja kvasca u podlogu su još dodane soli [(NH₄)₂HPO₄ i (NH₄)₂SO₄] odnosno kvašičev ekstrakt (izvor peptida, aminokiselina i vitamina).

Dinamika odvijanja anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* na kontrolnoj podlozi prikazana je na Slici 1. gdje je vidljivo da je potrošnja glukoze usko povezana s povećanjem koncentracije etanola. Nadalje, potrebno je istaknuti da je zabilježeno i smanjenje koncentracije ksiloze od 0,2 g L⁻¹ najvjerojatnije kao posljedica analitičke pogreške. Naime, poznato je da sojevi kvasca *S. cerevisiae* nemaju sposobnost da koriste pentoze (ksiloza i arabinaza; van Maris i sur. 2006). Promjene koncentracije arabinoze nisu zabilježene tijekom ovog kratkog anaerobnog uzgoja kvasca. Međutim, zabilježeno je povećanje brojčane koncentracija stanica kvasca s 5,5 x 10⁵ st/mL na 6,2 x

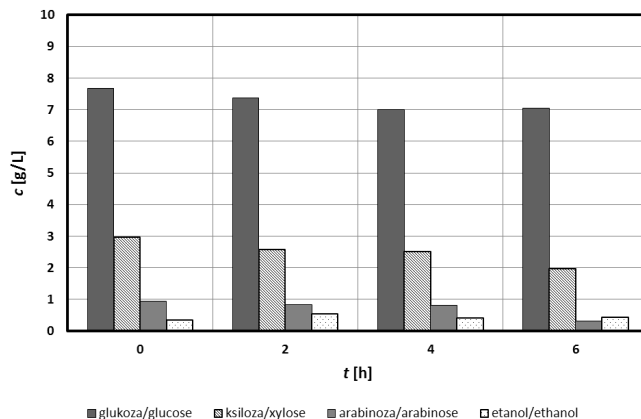


10^6 st/mL odnosno glicerola što pokazuje da kontrolna hranjiva podloga omogućava rast i održavanje metaboličke aktivnosti stanica kvasca. Na slikama 2 i 3 prikazana je dinamika anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. Promjena koncentracije glukoze usko je povezana s nastajanjem etanola. U ovom slučaju zabilježene su također i neznatne promjene koncentracije ksiloze i arabinoze kao posljedica analitičkih pogrešaka (Slika 2). Kao što je vidljivo na Slici 3 došlo je do smanjenja koncentracije mravlje i octene kiseline odnosno glicerola zbog sposobnosti stanica kvasca da koriste ove spojeve u svom metabolizmu (van Dijken i Scheffers 1986, Weusthuis i sur 1994). Tijekom ovog uzgoja zabilježeno je neznatno povećanje brojčane koncentracija stanica kvasca s $5,1 \times 10^5$ st/mL na $5,8 \times 10^5$ st/mL što pokazuje da prisutvo inhibitora rasta kvasca u ovoj hranjivoj podlozi usporava rast kvasca u usporedbi s uzgojem kvasca na kontrolnom podlozi. Koncentracija levulinske kiseline je ostala približno konstantna iako su zabilježena određena odstupanja (oko $0,2 \text{ g L}^{-1}$) kao posljedica analitičke pogreške. Navedena pojava je u skladu s literaturom jer stanice kvasca nemaju sposobnost korištenja levulinske kiseline budući da ona ima inhibitorno djelovanje na rast stanica kvasca (Palmqvist i Hahn-Hägerdal 2000; Klinke i sur. 2004). Kod anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine (podaci nisu prikazani) zabilježeno je slično odvijanje bioprocasa kao i kod anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame.



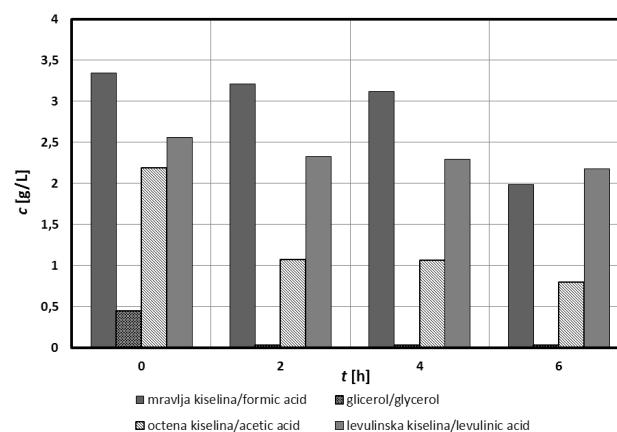
Slika 1. Promjene koncentracije sastojaka kontrolne hranjive podloge tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

Figure 1. Alteration of the concentration of control broth constituents during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in Erlenmeyer flasks.



Slika 2. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola u hranjivoj podlozi koja sadrži hidrolizat pšenične slame tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

Figure 2. Alteration of the concentration of glucose, xylose, arabinose and ethanol in broth that contains wheat straw hydrolysate during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in Erlenmeyer flasks.



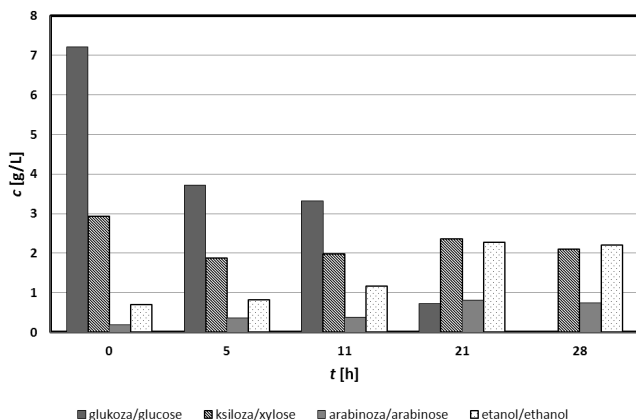
Slika 3. Promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline odnosno glicerola u hranjivoj podlozi koja sadrži hidrolizat pšenične slame tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

Figure 3. Alteration of the concentration of formic, acetic and levulinic acid and glycerol in broth that contains wheat straw hydrolysate during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in Erlenmeyer flasks.

Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u HRCB-u

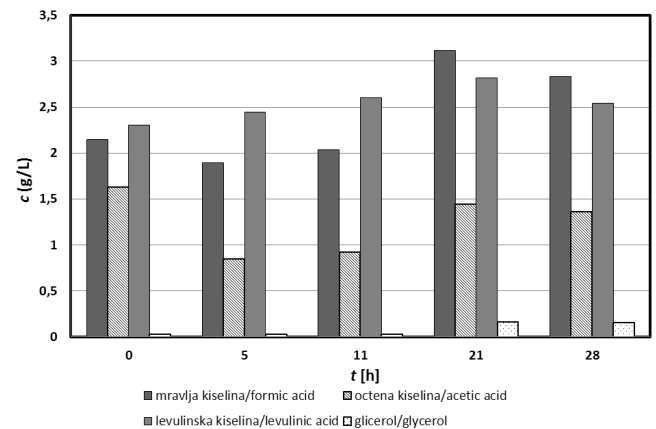
U nastavku ovog istraživanja provedeno je dodatno testiranje anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* u HRCB-u da bi se potvrdili rezultati uzgoja u Erlenmeyer tikvicama. U ovom istraživanju korištena je intervalna rotacija HRCB-a (12 minuta rotacije bioreaktora brzinom 10 min^{-1} i 48 minuta mirovanje po satu), a korisni volumen HRCB-a iznosio je 5 L. Prethodno odabrani uvjeti provođenja anaerobnog uzgoja kvasca u HRCB-u su u skladu s istraživanjem proizvodnje etanola na sirovim repinim rezancima (polučvrsti supstrat) u HRCB-u kod

kojih su zabilježene najveće vrijednosti pokazatelje uspješnosti bioprocesa (Pavlečić 2013.). Hranjive podloge s hidrolizatima pšenične slame i kukuruzovine bile su istog sastava kao i kod anaerobnog uzgoja kvasca u Erlenmeyer tikvicama. Na slikama 4 i 5 prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. Kao što je vidljivo na slici 4 glukoza je potpuno utrošena do kraja bioprocesa pri čemu je kao posljedica njene potrošnje tijekom anaerobnog uzgoja kvasca došlo do sinteze etanola i glicerola (Slika 5). Tijekom ovog uzgoja zabilježene su određene oscilacije koncentracije ksiloze i arabinoze kao posljedica nehomogenosti polučvrste hranjive podloge u HRCB-u odnosno analitičkih pogreška budući da kvasac *S. cerevisiae* ne može koristiti pentoze kao izvore ugljika. Budući da su u hidrolizatu pšenične slame prisutne mravlja, octena i levulinska kiselina (nusprodukti postupka blago kisele hidrolize), promjene njihovih koncentracija također su praćene tijekom anaerobnog uzgoja kvasca u HRCB-u (Slika 5). Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su koncentracije ovih kiselina oscilirale oko svojih početnih vrijednosti što pokazuje da ih kvasac nije koristio. Navedene oscilacije su posljedica analitičkih pogrešaka, ali i nehomogenosti polučvrstog supstrata u HRCB-u. U ovom uzgoju zabilježeno je i neznatno povećanje brojčane koncentracija stanica kvasca s $5,3 \times 10^5$ st/mL na $6,1 \times 10^5$ st/mL što pokazuje da prisutvo inhibitora rasta u ovoj hranjivoj podlozi usporava rast i aktivnost stanica kvasca.



Slika 4. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola u hranjivoj podlozi koja sadrži hidrolizat pšenične slame tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u HRCB-u.

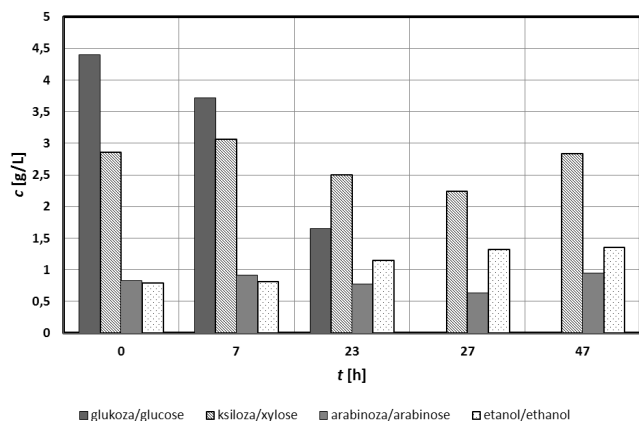
Figure 4. Alteration of the concentration of glucose, xylose, arabinose and ethanol in broth that contains wheat straw hydrolysate during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in the HRTB.



Slika 5. Promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline odnosno glicerola u hranjivoj podlozi koja sadrži hidrolizat pšenične slame tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u HRCB-u.

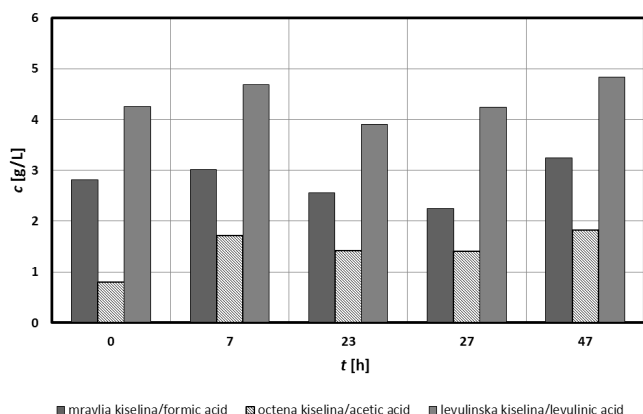
Figure 5. Alteration of the concentration of formic, acetic and levulinic acid and glycerol in broth that contains wheat straw hydrolysate during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in the HRTB.

U ovom dijelu istraživanja proveden i anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatima kukuruzovine, a rezultati su prikazani na slikama 6 i 7. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je zabilježena vrlo slična dinamika odvijanja bioprocesa kao i kod anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. Međutim, potrebno je istaknuti da se početna brojčana koncentracija stanica kvasca ($6,7 \times 10^6$ st/mL) smanjila na $5,4 \times 10^5$ st/mL kao posljedica većih koncentracija kiselina (mravlja, octena i levulinska kiselina) u odnosu na hranjivu podlogu s hidrolizatom pšenične slame. Navedena pojava povezana je i činjenicom da su u ovom uzgoju zabilježene manje vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocesa nego kod uzgoja na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (Tablica 6). Ovdje je također potrebno istaknuti da su u hidrolizatima pšenične slame i kukuruzovine prisutni osim analiziranih spojeva (ukupni furani, octena, mravlja i levulinska kiselina) i drugi spojevi čija je prisutnost utjecala na aktivnost stanica kvasca tijekom njihovog anaerobnog uzgoja. Rezultati prikazani u Tablici 6 također pokazuju da su u odnosu na šećerne i škrobne sirovine (Cardona i Sanchez 2007; Šantek i sur. 2010) dobivene znatno manje vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocesa zbog činjenice da testirani soj kvasca nema sposobnost korištenje pentozama kao izvora ugljika. Međutim, ako se provode usporedbe uzgoja kvasca na sličnim hranjivim podlogama onda su dobiveni rezultati u skladu s literaturnim podacima (Hadar 2013; Rezić i sur. 2016). Prethodno navedeno također pokazuje da je potrebno provesti dodatan postupak optimizacije procesa predobrade lignoceluluznih sirovina s ciljem povećanja udjela fermentabilnih šećera uz smanjenje nastanka različitih nusprodukata, a osobito inhibitora fizioloških aktivnosti stanica kvasca. Nadalje, neophodno je provesti i daljnji proces selekcije i unapređenje postojećih sojeva kvasaca primjenom tehnika genetičkog inženjstva s ciljem dobivanja sojeva koji mogu metabolizirati pentoze u prisustvu inhibitora njihovog rasta.



Slika 6. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola u hranjivoj podlozi koja sadrži hidrolizat kukuruzovine tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u HRCB-u.

Figure 6. Alteration of the concentration of glucose, xylose, arabinose and ethanol in broth that contains corn stover hydrolysate during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in the HRTB.



Slika 7. Promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline odnosno glicerola u hranjivoj podlozi koja sadrži hidrolizat kukuruzovine tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* u HRCB-u.

Figure 7. Alteration of the concentration of formic, acetic and levulinic acid and glycerol in broth that contains corn stover hydrolysate during anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* in the HRTB.

Tablica 6. Pokazatelji uspješnosti anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u HRCB-u.

Table 6. Bioprocess efficiency of the anaerobic cultivation of yeast *S. cerevisiae* on the broth with different hydrolysate of lignocellulosic raw materials in the HRTB.

Hranjiva podloga / Cultivation medium	Y_p [g L ⁻¹]	$Y_{p/S}$ [g g ⁻¹]	E [%]	Pr [g L ⁻¹ h ⁻¹]
Hidrolizat pšenične slame / Wheat straw hydrolysate	1,560	0,216	42	0,0678
Hidrolizat kukuruzovine / Corn stover hydrolysate	0,862	0,195	38	0,0330

Zaključci

Na osnovi rezultata ovog istraživanja vidljivo je da blago kiselim postupkom predobrade pšenične slame i kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru (210 °C; 20 bara; 1,0 % H₂SO₄; vrijeme zadržavanja 1-10 minuta) nastaju različiti nusprodukti (npr. mravlja, octena i levulinska kiseline, furfural, hidroksimetil-furfural itd.) koji utječu na aktivnost stanica kvasca *S. cerevisiae* tijekom njegovog anaerobnog uzgoja. Međutim, i kod tih relativno velikih koncentracija nusprodukata procesa predobrade lignoceluloznih sirovina zabilježen je rast stanica kvasca kao posljedica korištenja glukoze što pokazuje da proučavani soj kvasca ima određenu otpornost na prisutne inhibitore rasta. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* u HRCB-u na polučvrstim hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina pokazuje da su najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa zabilježene tijekom uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame ($Y_{p/S} = 0,261$ g g⁻¹, $Pr = 0,0678$ g L⁻¹ h⁻¹ i $E = 42$ %). Na osnovi rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je moguće unaprijediti proces proizvodnje etanola na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina kroz optimizaciju uvjeta provođenja bioprocasa u HRCB-u, uvjeta predobrade lignoceluloznih sirovina i odabirom proizvodnog mikroorganizma (prirodnog ili genetičkim modificiranog soja) koji ima sposobnost korištenja heksoza i pentoza odnosno visoku tolerantnost na inhibitore prisutne u hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina.

Zahvala

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti" (SPECH-LRM; 9158).



Literatura References

- Alriksson B., Sjöde A., Nilvebrant, N.O., Jönsson L.J. (2006) Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 130 (1) 599-611.
- Alviera P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., Negro M. J. (2009) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101 (13) 4851-4861.
- Bajpai P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, Springer, Singapore, Malaysia, str 8.
- Balat M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway, A review. *Energy Conversion and Management*, 52 (2) 858-875.
- Boe A., Jeranyama P., Lee D.K., Owens V.N. (2007) Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks, South Dakota State University, USA, str. 5.
- Cardona C.A., Sanchez O.J. (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98 (12) 2415-2427.
- Hadar Y. (2013) Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol, U: Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production (Faraco, V., ured.), Springer, Njemačka, str. 21-38.
- Hamelick C.N., van Hooijdonk G., Faaji A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28 (4) 384-410.
- Chen H., Fu X. (2016) Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57 468-478.
- Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u Industriji*, 65 (1-2) 25-38.
- Juanbaro J., Puigjaner L. (1985) Saccharification of concentrated brewing bagasse slurries with dilute sulfuric acid for producing acetone-butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28 (10) 1544-1554.
- Jørgensen H., Kristensen J.B., Felby C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1 (2) 119-134.
- Kang Q., Appels L., Tan T., Dewil R. (2014) Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities. *The Scientific World Journal*, 2014, Article ID298153.
- Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 (1)10-26.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48 (8) 3713-3729.
- Lee D., Owens, V.N., Boe A., Jeranyama P. (2007) Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks. North Central Sun Grant Center, South Dakota State University, USA, str.5.
- Nigam S.P., Pandey A. (2009) Utilisation of solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. *Bio-technology for agroindustrial residues*, Springer Netherlands, str.197-221.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74 (1) 25-33.
- Parawira W., Tekere M. (2011) Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31 (1) 20-31.
- Pavlečić M. (2013) Proizvodnja etanola na različitim međuproduktima šećerne repe i matematičko modeliranje tih procesa. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Philippoussis A.N. (2009) Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates, *Biotechnology for agro-industrial residues*, 164-187.
- Pointner M., Kuttner P., Obrlik T., Jäger A., Kahr H. (2014) Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agronomy Research*, 12 (2) 391-396.
- Pordesimo L.O., Hames, B.R., Sokhansanj S., Edens W.C. (2005) Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass and Bioenergy*, 28 (4), 366-374.
- Rezić T., Ivančić Šantek M., Andlar M., Pavlečić M., Šantek B. (2016) Comparison of different techniques for bioethanol production from lignocellulosic raw materials. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 12 (1-2), 6-17.
- Schobert H.H. (2013) Chemistry of Fossil Fuels and Biofuels, Cambridge University Press, New York, USA.
- Seung G.W., Jin Cho E., Lee D. S., Lee S. J., Ju Lee Y., Bae H.J. (2015) Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 8 228.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. (2012) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL Technical Report.
- Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83 (1) 1-11.
- Svetlitchnyi V.A., Kensch O., Falkenhan D.A., Korseska S.G., Lippert N., Prinz M., Sassi J., Schickor A., Curvers S. (2013) Single-step ethanol production from lignocellulose using novel extremely thermophilic bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 6 31.
- Šantek B., Gwehenberger G., Ivančić Šantek M., Narodslawsky M., Horvat P. (2010) Evaluation of energy demand and the sustainability of



different bioethanol production processes from sugar beet. *Resources, Conservation and Recycling* 54 (11) 872-877.

van Dijken J.P., Scheffers W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Review* 32 (3-4) 199-224.

van Maris A.J.A., Abbott D.A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Luttik M.A. H., Wisselink W.H., Scheffers W.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90 (4) 391-418.

Wang L., Yang M., Fan X., Zhu X., Xu T., Yuan Q. (2011) An environmentally friendly and efficient method for xylitol bioconversion with high-temperature-steaming corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*. *Process Biochemistry*, 46 (8) 1619-1626.

Weusthuis R.A., Visser W, Pronk J.T., Scheffers W.A., van Dijken J.P. (1994) Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology*, 140 (4) 703-715.

Wyman C.E. (1996) Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Taylor & Francis, London,UK, str. 29.